

# **DIE EXPRESSION DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS CBFA1 VON OSTEO-KARTILAGINÄREM GEWEBE IN VITRO IN ABHÄNGIGKEIT VON ZELLPASSAGE UND KULTIVIERUNGSMETHODE**

**MARKUS SCHALLER**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**édition scientifique**  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

**Die Expression des Transkriptionsfaktors Cbfa1 von  
osteo-kartilaginärem Gewebe in vitro in Abhängigkeit von  
Zellpassage und Kultivierungsmethode**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Markus Schaller**

aus Berlin

Gießen 2007

Aus dem Institut für Pathologie  
der Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH, Standort Giessen

Leiter: Prof. Dr. med. A. Schulz

Gutachter: Prof. Dr. A. Schulz

Gutachter: PD Dr. U. Sibelius

Tag der Disputation: 04.12.2007

***Meiner Familie gewidmet***

# Inhalt

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1 Knorpelgewebe	7
1.2 Aufbau des Gelenkknorpels	8
1.3 Entwicklung von osteochondralem Gewebe	9
1.3.1 Knochenentwicklung	9
1.3.2 Knorpelentwicklung	10
1.4 Pathomechanismen der Osteoarthritis: Zerstörung der Gelenkknorpelmatrix bzw. Ungleichgewicht von anabolen und katabolen Prozessen	11
1.5 Zellkulturmodelle	14
1.5.1 Osteosarkomzellkulturen	15
1.5.2 Osteoblastenkulturen	15
1.5.3 Chondrozytenkulturen	16
1.6 Differenzierung von Chondrozyten in der Monolayer-Zellkultur	17
1.7 Cbfa1	18
 <b>2. Fragestellung</b>	 <b>22</b>
 <b>3. Material und Methoden</b>	 <b>24</b>
3.1 Zellkultur	24
3.1.1 Gewinnung der Knochenfragmente	24
3.1.2 Gewinnung von Knochenmarkstammzellen (Präosteoblasten)	24
3.1.3 Gewinnung von „Collagenase Released“ (aktiven) Osteoblasten	25
3.1.5 Kultivierung und Passagierung	25
3.1.6 Osteosarkomzelllinien	25
3.1.7 Isolation von humanen Knorpelzellen und Kultivierung in der Monolayerkultur	27
3.1.8 In vitro Inkubation in der Alginatkultur	28
3.2 Zellzählung der Zellen	28
3.3 RNA-Isolierung/PCR	29
3.3.1 RNA-Extraktion	29
3.3.2 Reinigung der gesamten RNA-Präparation von genomischer DNA	30
3.3.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	31
3.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)	32
3.3.5 Herstellen des Agarose-Gels / Durchführung der Gel-Elektrophorese	34
3.3.6 Real-Time-PCR	34
3.4 Versuchsaufbau	36
3.5 Auswertung und Statistik	37
 <b>4. Ergebnisse</b>	 <b>38</b>
4.1 Kultivierung von humanen Chondrozyten, Osteoblasten und Osteosarkomzellen	38
4.2 Qualitativer Nachweis von Cbfa1-RNA in Osteoblasten, Chondrozyten und Osteosarkomzellen mittels RT-PCR	40
4.3 Nachweis von Cbfa1 und HPRT in der Monolayerkultur in Abhängigkeit von der Zellpassage	42
4.4 Nachweis von Cbfa1 und HPRT in Abhängigkeit von der Kultivierungsmethode	43

4.5	Sequenzierung des PCR-Produktes	44
4.6	Quantitative Bestimmung der Cbfa1 RNA-Expression mittels Realtime-PCR	45
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>48</b>
5.1	Veränderungen von Chondrozyten in vitro in Abhängigkeit von der Kultivierungsmethode	48
5.2	Nachweis von Cbfa1-RNA in Osteoblasten, Osteozyten, den Osteosarkomzelllinien SaOS-2, HOS 58 und MG 63, und kultivierten Chondrozyten	49
5.3	Anstieg der Cbfa1-RNA Expression von Chondrozyten in der Monolayerkultur	50
5.4	Veränderungen der Cbfa1-RNA Expression humaner Chondrozyten in Abhängigkeit von der Kultivierungsmethode	51
5.5	Abfall der Cbfa1-RNA-Expression nach Überführung von zuvor im Monolayer kultivierten Chondrozyten in eine Alginatkultur	52
5.6	Mögliche Relevanz für das Krankheitsbild der Osteoarthritis	53
5.7	Plastizität bzw. Transdifferenzierung	54
5.8	Klinische Relevanz	57
5.9	Ausblick	60
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>62</b>
<b>7.</b>	<b>Summary</b>	<b>65</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>66</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang</b>	<b>87</b>
	Erklärung	87
	Vorträge, Posterpräsentationen und Buchbeiträge	88
	Liste der verwendeten Materialien	90
	Abkürzungsverzeichnis	93
	Danksagung	94
	Lebenslauf	95

# 1. Einleitung

Die Osteoarthritis ist eine weit verbreitete Erkrankung, die mit einer chronischen, fortschreitenden Zerstörung des Gelenkknorpels einhergeht. Schätzungen gehen davon aus, dass etwa die Hälfte der deutschen Bundesbürger arthrotische Gelenkveränderungen aufweisen. Ein Fünftel davon sind behandlungsbedürftig (Mielke, 1984, Wagenhäuser, 1984).

Volkswirtschaftlich entsteht durch die Osteoarthritis ein enormer Schaden. Die direkten Kosten für Behandlung, Gelenkersatzoperationen und die häusliche Pflege beliefen sich nach Schätzungen aus dem Jahr 1990 auf ca. 3,5 Milliarden Euro, die indirekten Kosten durch Arbeitsausfälle wurden damals auf ca. 15 Milliarden Euro geschätzt (Statistisches Bundesamt, 2002).

Ein wichtiger Pathomechanismus, gerade im Hinblick auf die frühzeitige Kniegelenksarthrose, sind unbehandelte Gelenkknorpeldefekte. Knorpelgewebe besitzt eine nur sehr gering ausgeprägte Regenerationsfähigkeit. Gelenkknorpel weist keine Blutgefäße auf, ist nicht innerviert und alymphatisch. Die eingeschränkte Proliferations- und Migrationsfähigkeit der Chondrozyten, die fehlende Durchblutung des Gelenkknorpels und, damit verbunden, die fehlende Invasion von pluripotenten Bindegewebszellen limitieren die Heilungspotenz des Gewebes (Mankin, 1982). Nach - auch nur oberflächlicher - Zerstörung von Knorpelgewebe kommt es daher meist zur Bildung von Narbengewebe als Ersatzgewebe. Dieses erfüllt jedoch nicht die gleichen Ansprüche an Belastbarkeit, Elastizität etc. wie hyaliner Knorpel (Leonhardt, 1990). Deformierung, Funktionsverlust und Schmerzen sind die Folge.

Ein Herausögern der Knorpelschädigung oder gar die Induktion von neuem Knorpelwachstum würde neben der Steigerung der Lebensqualität breiter Bevölkerungsschichten auch einen volkswirtschaftlichen Gewinn bedeuten.

Bei der Suche nach therapeutischen Ansätzen ist es von essentieller Bedeutung, die grundlegenden Mechanismen der physiologischen Knorpel- und Knochenentwicklung sowie die Pathomechanismen bei der Entstehung der Osteoarthritis zu verstehen.



## 1.1 Knorpelgewebe

Knorpelgewebe entsteht entwicklungsbiologisch aus dem Mesoderm. Es besteht aus den Knorpelzellen (Chondrozyten) sowie einer extrazellulären Matrix, welche durch die Chondrozyten gebildet wird. Aufgrund der Morphologie und Zusammensetzung der extrazellulären Matrix wird Knorpel in drei Typen unterteilt (Leonhard, 1990, Kühnel, 1995):

1. Elastischer Knorpel: Diese Knorpelform findet sich unter anderem in der Ohrmuschel, der Ohrtrumpete, im äußeren Gehörgang und im Kehlkopfdeckel. Er ist gekennzeichnet durch die ausgeprägte Elastizität der extrazellulären Matrix (Leonhard, 1990).
2. Faserknorpel: Faserknorpel zeichnet sich durch eine sehnige Struktur aus. Die extrazelluläre Matrix besteht hier zum größten Teil aus Kollagenfasern. Er zeichnet sich durch eine hohe Zugfestigkeit aus bei geringer Elastizität. Man findet Faserknorpel in den Zwischenwirbelscheiben, der Schambeinfuge, dem Kiefergelenk und in den Menisci (Leonhard, 1990).
3. Hyaliner Knorpel: Der hyaline Knorpel erhielt seinen Namen aufgrund seines bläulichen, gläsernen und durchscheinenden Aussehens (gr.: ὑαλος (hyalos) =glasartig, durchsichtiger Stein). Es handelt sich um die häufigste Knorpelart. Er ist funktionell vorwiegend auf Druckbeanspruchung ausgelegt. In Wirbeltieren ist er in zwei funktional verschiedenen Situationen, als permanenter Knorpel (z.B. in Gelenken) oder als Ersatzknorpel (z.B. in Wachstumsfugen), vorzufinden. Permanenter hyaliner Knorpel kommt im adulten Organismus neben den Gelenken in der Trachea, der Nase, dem Kehlkopf, den Bronchien und den Rippen vor (Leonhard, 1990).

Da die nachfolgenden Untersuchungen an Knorpelgewebe aus humanen Hüft- und Kniegelenken durchgeführt worden sind, wird im folgenden Kapitel näher auf den Aufbau des hyalinen Gelenkknorpels eingegangen:

## 1.2 Aufbau des Gelenkknorpels

Der hyaline Gelenkknorpel kleidet als ein hochspezialisiertes Gewebe die korrespondierenden Gelenkoberflächen aus. Er besteht aus einer avaskulären, alymphatischen extrazellulären Matrix, die von den dort ansässigen Zellen, den Chondrozyten, gebildet wird.

Histologisch kann das Knorpelgewebe in unterschiedliche Zonen unterteilt werden: eine oberflächliche Zone mit eher kleinen, flachen, parallel zur Knorpeloberfläche (entlang der Kollagenfasern) ausgerichteten Chondrozyten, eine mittlere Zone mit größeren, eher rundlichen Zellen, die keine spezifische Ausrichtung oder Beziehung zu der Knorpelmatrix zeigen, eine tiefe Zone mit säulenförmiger Ausrichtung der Zellen entlang der Kollagenfasern und die kalzifizierte Zone, die die Verbindung zwischen dem elastischen Knorpelgewebe und dem steifen Knochen herstellt. Die Lage der Chondrozyten innerhalb des Knorpelgewebes scheint mit unterschiedlichen Eigenschaften der Zellen einherzugehen (Aydelotte und Kuettner, 1988). Die Chondrozyten machen jedoch insgesamt weniger als 1% des Knorpelvolumens aus. Den Hauptanteil des Knorpelgewebes bildet die extrazelluläre Knorpelmatrix.

Die extrazelluläre Knorpelmatrix kann in zwei Regionen eingeteilt werden: In die territoriale- sowie die extraterritoriale Matrix. Die territoriale Matrix besteht aus einem dichten Proteoglykanmantel, der direkt der Plasmamembran der Chondrozyten angelagert ist, sowie, dem Proteoglykanmantel angrenzenden, tangential angeordneten Kollagenfibrillen (hauptsächlich bestehend aus Kollagen Typ VI). Den weitaus größeren Anteil der Knorpelmatrix macht jedoch die extraterritoriale Matrix aus. Sie besteht hauptsächlich aus einem Netzwerk von Kollagenfibrillen (überwiegend Kollagen Typ II, in geringeren Teilen Kollagen Typ IX und XI). Diese sind über fibrillenassoziierte Verbindungsmoleküle (Fibrillenoberflächenkomponenten) untereinander vernetzt (Bruckner und van der Rest, 1994). Ein weiterer Bestandteil der extraterritorialen Knorpelmatrix ist das Proteoglykan Aggrekan, welches in das Kollagennetzwerk eingelagert ist (Roughley und Lee, 1994). Aggregate, bestehend aus Hunderten von Aggrekanmolekülen mit einem Molekulargewicht von mehreren Millionen Dalton, sind an sehr langkettige Hyaluronsäuren gebunden. Aufgrund seiner stark negativ geladenen Chondroitin-Sulfat-Seitenketten besitzt das Aggrekan eine extrem hohe

Wasserbindungskapazität. Der Gegenpol zu dem hierdurch erzeugten Schwelldruck wird durch das Kollagennetzwerk gebildet. Durch das Zusammenspiel dieser divergierenden Kräfte ist die außergewöhnliche Elastizität des Knorpels zu erklären. Bei Belastung entweicht ein Teil des an das Aggrecan gebundenen Wassers. Dabei verringert sich die Distanz zwischen den negativen Ladungen der Keratan- und Chondroitinsulfatketten. Eine weitere Kompression des Knorpels wird durch die nun wachsenden elektrostatischen Abstoßungskräfte verhindert. Nach Abfall der Belastung können die Wassermoleküle aufgrund der elektrostatischen Abstoßung der Polysaccharide untereinander und aufgrund der auf sie einwirkenden Anziehungskraft der negativen Ladungszentren zurückfließen und das Gewebe in die Ausgangskonfiguration zurückkehren (Otte, 2001).

Größere Umbauprozesse der extrazellulären Matrix finden in gesundem Knorpelgewebe normalerweise nicht statt. Die Halbwertszeit der Knorpelmatrix wird auf etwa 100 Jahre beziffert (Aigner und Kim, 2002).

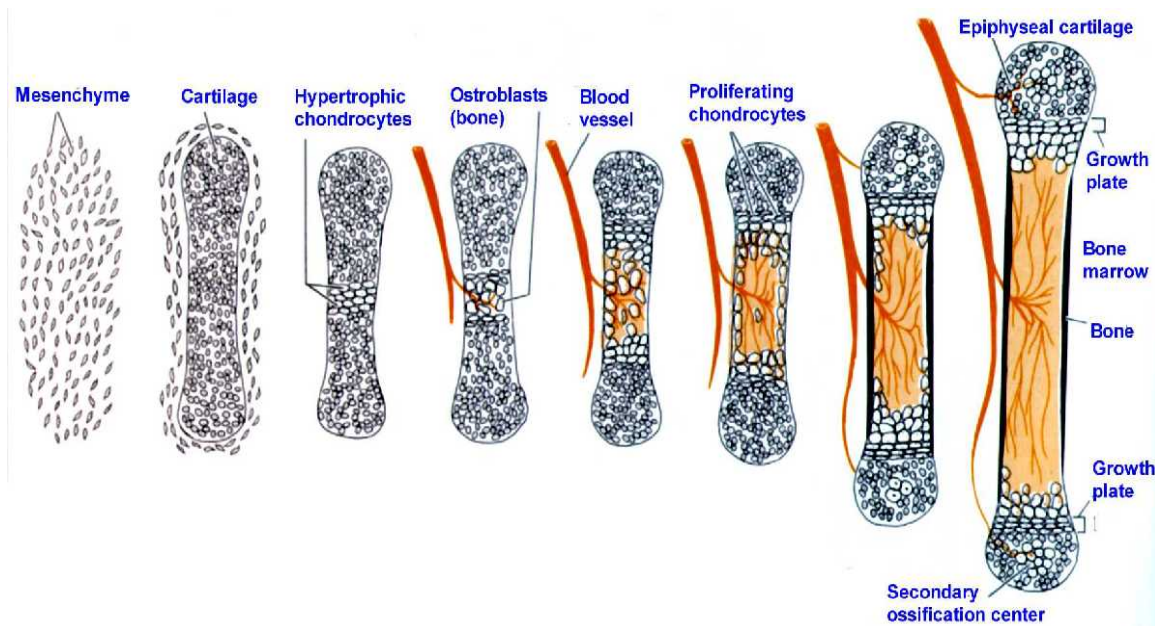
## **1.3 Entwicklung von osteochondralem Gewebe**

### **1.3.1 Knochenentwicklung**

Zwei verschiedene Mechanismen spielen bei der Bildung des Knochenskeletts eine entscheidende Rolle: die intramembranöse bzw. desmale Ossifikation und die enchondrale Ossifikation.

Bei der intramembranösen Knochenentwicklung entsteht die Knochenmatrix direkt durch die Differenzierung von mesenchymalen Zellen in Osteoblasten. Bei der enchondralen Ossifikation wird zunächst eine knorpelige Vorstufe gebildet, welche im weiteren Verlauf durch Knochen ersetzt wird (de Combrugghe et al., 2001). Chondrozyten sondern zunächst eine knorpelspezifische extrazelluläre Matrix ab und proliferieren. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Hypertrophie der Chondrozyten gefolgt von einer Kalzifizierung der Umgebungsmatrix. Parallel hierzu lagern sich neu differenzierte Osteoblasten in einer dünnen Schicht über diese Matrix. Diese wird im weiteren Verlauf durch, von den Chondrozyten selbst produzierten, Metalloproteinasen wieder abgebaut. Die hypertrophierten Chondrozyten sterben ab. Zur selben Zeit wandern mesenchymale Zellen zusammen mit Blutgefäßen und Osteoklasten ein. Diese bauen die Knorpelmatrix

ab, die mesenchymalen Zellen differenzieren sich zu Osteoblasten, welche eine Kollagentyp-I-Matrix und knochenspezifische nicht-Kollagene Proteine sezernieren. Diese als Osteoid bezeichnete Matrix mineralisiert durch die Einlage von Calciumphosphaten.



**Abb. 1.3.1:** Zu Beginn der enchondralen Ossifikation kondensieren Zellen mesenchymalen Ursprungs zu knorpeligen Skelettelementen. Gleichzeitig hierzu bildet sich das Perichondrium, eine Umhüllung der Skelettelemente. Die Skelettelemente bestehen aus Chondrocyten, die zunächst proliferieren und später differenzieren. Im Laufe der Differenzierung bilden sich hypertrophe Chondrozyten, später findet in diesem Bereich die Blutgefäßinvasion und Knochenbildung statt. (Modifiziert nach Gilbert, 2000)

### 1.3.2 Knorpelentwicklung

Im Rahmen der embryonalen Entwicklung entstehen aus mesenchymalen Vorläuferzellen unter Abrundung und Einzug der cytoplasmatischen Fortsätze nach mehrfachen Teilungen Chondroblasten. Entscheidende Bedeutung haben hierbei den Sox-Transkriptionsfaktoren, insbesondere Sox 9, aber auch Sox 5 und 6 (de Combrugghe et al., 2001) und der Wachstumsfaktor transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). TGF- $\beta$  ist ein wichtiger Wachstums- und Differenzierungsfaktor im Rahmen der Knochen- und Knorpelentwicklung (Trippel, 1995). Bei mesenchymalen

Stammzellen kann mit Hilfe von TGF- $\beta$  eine chondrogene Differenzierung induziert werden (Mackay et al., 1998).

Die Chondroblasten beginnen nun nach und nach mit der Synthese der extrazellulären Matrix. Bedingt hierdurch rücken die Zellen immer weiter auseinander und differenzieren sich schließlich zu den eigentlichen Knorpelzellen: den Chondrozyten. Die Differenzierung des Knorpels findet also von innen nach außen statt. Das den Knorpel umgebende Mesenchym gestaltet sich zum Perichondrium mit fibroblastär differenzierten chondrogenen Zellen um. Dieses dient zeitlebens dem appositionellen Wachstum. Mit Ausnahme des Gelenkknorpels umgibt das Perichondrium alle hyalinen und elastischen Knorpeloberflächen.

#### **1.4 Pathomechanismen der Osteoarthritis: Zerstörung der Gelenkknorpelmatrix bzw. Ungleichgewicht von anabolen und katabolen Prozessen**

Besonders das Proteoglykan Aggrecan unterliegt im gesunden Knorpel einem ständigen Gleichgewicht zwischen Neusynthese und Degradation (Hardingham et al., 1994, van Kampen, 1992), während die Kollagenfibrillen eine Halbwertszeit von Jahrzehnten aufweisen.

Im Rahmen osteoarthrotischer Veränderungen finden sich unter anderem vermehrt kleine Aggrecanfragmente im Serum (Thonar et al., 1995). Diese entstehen hauptsächlich durch die Aktivität proteolytischer Enzyme, den Matrix-Metalloproteinasen (Fosang et al., 1991). Das Aggrecan verliert seine stabile Bindung in der Matrix und diffundiert in die Synovialflüssigkeit. Hierdurch wird die Parallelastizität reduziert, die Komprimierbarkeit des Knorpelgewebes wird erhöht, was wiederum eine vermehrte Belastung des Kollagengerüsts zur Folge hat (Maroudas, 1976).

Wird hingegen das Kollagennetzwerk (welches dem osmotischen Druck des Aggrecans entgegenwirkt) beschädigt, kommt es zu einer zunehmenden Schwellung des Knorpels. Dies führt zu einer vermehrten Rissbildung bis hin zum Abriss ganzer Matrixfragmente (Maroudas, 1976).

Ein dritter Pathomechanismus ist bei den Chondrozyten selbst zu finden. Es konnte gezeigt werden, dass Knorpelzellen versuchen, dem vermehrten Abbau von

Matrixbestandteilen durch eine Zunahme der Neusynthese von Matrixproteinen entgegenzuwirken (Rizkalla et al., 1992). Ein Vergleich der Chondrozyten untereinander zeigt, dass die Knorpelzellen in den oberen Schichten, also dort, wo es zur eigentlichen Progression der Matrixzerstörung kommt, vermindert Matrixproteine wie Aggrecan oder Kollagen Typ II exprimieren. Korrespondierend hierzu findet sich der Hauptproteoglykanverlust in den oberflächennahen Knorpelschichten. Eine hieraus abgeleitete Theorie erklärt dies durch eine Umdifferenzierung/Dedifferenzierung der Chondrozyten. Zahlreiche Studien zeigen, dass sich die oberflächennahen Chondrozyten bei arthrotischem Knorpelgewebe verglichen mit gesundem Knorpelgewebe zum Teil erheblich im Hinblick auf den Phänotyp aber auch hinsichtlich der Expression von Matrixproteinen unterscheiden (von der Mark, 1986, Schnabel et al., 2002).

Chondrozyten weisen in arthrotischem Gelenkknorpel einige Gemeinsamkeiten mit hypertrophiertem Knorpelgewebe im Rahmen der enchondralen Ossifikation auf. Zum einen ist die Produktion von Kollagen Typ X zu nennen, einem typischen Markerprotein für hypertrophierte Chondrozyten, das jedoch auch in arthrotisch verändertem Knorpelgewebe nachweisbar ist (Hamerman, 1989). Weitere Gemeinsamkeiten sind die vermehrte Expression von transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und parathyroid hormone related protein (PTHrP) (Serra et al., 1997, Karpouzas und Terkeltaub, 1999). Auch makroskopische Gemeinsamkeiten sind unverkennbar: Häufig finden sich Kalzifizierungen der extrazellulären Matrix in gealtertem, osteoarthrotisch/-itisch verändertem Knorpel. Auch knochentypische Proteine wie Osteocalcin, Osteopontin, Osteonectin oder alkalische Phosphatase lassen sich sowohl im arthrotischen Knorpel, als auch im Säulenknorpel der Wachstumsfuge nachweisen.

Weiterhin kommt es im Rahmen von osteoarthrotischen Knorpelveränderungen zu einer stadienabhängigen Expression von Kollagen Typ I (Miosge et al., 2004, Tesche und Miosge, 2005), einem Kollagen, welches typischerweise von Fibroblasten gebildet wird, jedoch auch im Rahmen der enchondralen Ossifikation nachweisbar ist.

Unter Zellkulturbedingungen, insbesondere in der Monolayerkultur, kommt es bei Chondrozyten ebenfalls zu einer Expression von Kollagen Typ I (Mayne et al., 1976, Benya et al., 1977 und 1978, von der Mark et al., 1977).

Der vor allem im englischen Sprachraum verbreitete Begriff der Osteoarthritis implementiert zudem, dass bei dieser Erkrankung nicht nur dem Gelenkknorpel allein pathophysiologische Bedeutung zukommt. In der Tat zeigen neuere Untersuchungen, dass es sich hierbei um ein komplexes Krankheitsbild mit Veränderungen der periartikulären Muskeln, des Bandapparates, der Synovia, des neurosensorischen Systems und vor allem auch des Knochens handelt (Felson und Neogi, 2004).

Typischerweise zeigt sich im Rahmen arthrotischer Gelenkveränderungen insbesondere subchondral eine vermehrte Knochenproliferation. Diese Proliferation drückt sich auch aus in den periartikulären Verknöcherungstendenzen (Verknöcherung der Sehnenansätze, der Gelenkkapsel etc.) sowie in der Ausbildung von Osteophyten. Ein Diagnosekriterium des American College of Rheumatology für die Osteoarthritis des Knies oder der Hände ist das Vorhandensein von Osteophyten. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde schon seit längerem spekuliert, dass der Knochen das primäre Organ für die Triggerung der Osteoarthritis sein könnte. Durch Mikrofrakturierungen der Knochentrabekel und die nachfolgenden Reparationsvorgänge könnte die Steifigkeit des subchondralen Knochengewebes erhöht werden. Durch die hierdurch entstehende erhöhte Druckbelastung des Gelenkknorpels käme es dann zu einer Zerstörung der Knorpelmatrix. Diese Theorie wurde zunächst durch Experimente erhärtet, bei denen durch Versteifung des subchondralen Knochens mittels Methylmethacrylat eine Osteoarthritis induziert werden konnte (Radin et al., 1982). In späteren Tierversuchen zeigte sich jedoch, dass der Knorpelverlust im Rahmen der Arthroseentstehung schon in einem Stadium nachweisbar ist, in dem die subchondrale Knochentrabekelstruktur noch nicht verändert ist. Die Proliferation des subchondralen Knochengewebes trat erst in späteren Stadien auf (Layton et al., 1988, Dedrick et al., 1993).

Untersuchungen beim Menschen konzentrieren sich üblicherweise auf spätere Stadien der Osteoarthritis, in der die typische subchondrale Knochenproliferation schon nachgewiesen werden kann. Jedoch scheinen auch hier initial die Knorpelveränderungen im Vordergrund zu stehen. Der subchondrale Knochen des arthrotischen Gelenkes scheint im Vergleich zum gesunden anfangs sogar weniger Steifigkeit zu besitzen (Ding et al., 1998). Eine definitive Aussage, ob initial die Knochen- oder die Knorpelveränderungen im Vordergrund stehen, kann jedoch zum

aktuellen Zeitpunkt nicht gemacht werden. In jedem Fall können sowohl der Verlust der Knorpelmatrix als auch die vermehrte Sklerosierung des subchondralen Knochens zwei (evtl. voneinander unabhängige) Pathomechanismen der Osteoarthritis als Folge der erhöhten mechanischen Belastung sein.

Aufgrund der Gemeinsamkeiten von Chondrozyten in arthrotisch verändertem Knorpelgewebe und hypertrophierten Chondrozyten bei der enchondralen Ossifikation, und aufgrund der Knochenveränderungen im Rahmen der Osteoarthritis mit vermehrter subchondraler Sklerosierung und der Bildung von Osteophyten (als Folge einer extraossär stattfindenden enchondralen Ossifikation) erscheint das Verständnis der embryonalen Entwicklung von osteochondralem Gewebe essentiell zu sein für die Erforschung pathophysiologischer Zusammenhänge im Rahmen der Osteoarthritis.

## **1.5 Zellkulturmodelle**

Die Arbeitsgruppe um Earle kultivierte 1943 erstmals kontinuierlich wachsende Mausfibroblasten. 1955 stellte Eagle das erste definierte Medium zusammen. Seit Ende der siebziger Jahre erfolgt die Anzucht von Zellen in, mit einer hydrophoben Oberfläche beschichteten, Polystyrol-Einmalgefäßen. Serum im Medium wurde lange Zeit als notwendig angesehen, da es essentielle Faktoren und Proteine enthält. Physiologisch ist im engeren Sinne das Wachstum in einem serumhaltigen Medium jedoch nicht, denn normales Gewebe oder Tumorgewebe steht in vivo nicht direkt mit Plasma in Kontakt. Zudem ist das Wachstum im serumhaltigen Medium hinsichtlich seiner Inhaltsstoffe wenig standardisierbar.

Insbesondere die Ergebnisse zur Beurteilung vom Hormon-, Wachstumsfaktoren oder Zytokineinfluss müssen daher mit großem Vorbehalt interpretiert werden. Mittlerweile ist es möglich, Zellen in serumfreiem Medium zu züchten (Knuchel et al. 1994).

Gerade wenn Fragestellungen über die Wirkung einzelner Substanzen auf bestimmte Zellen vorliegen, kommen Zellkulturen als das kleinste zellbiologisch kontrollierbare Modell zur Anwendung. Diese sind durch in vivo Experimente aufgrund der Vielzahl der Einflussfaktoren auf die zu testende Zellpopulation in einem komplexen Organismus naturgemäß nicht hinreichend genau zu klären.



### **1.5.1 Osteosarkomzellkulturen**

Humane Osteosarkomzellkulturen sind seit vielen Jahren Gegenstand von Zellkulturexperimenten. Ihre Isolierung aus dem Tumorgewebe und Etablierung als Monolayerkulturen erfolgt nach Spülung, Gewebedissektion, enzymatischer Zellseparation und Zentrifugation. Nach weiterer Subkultivierung erhält man homogene Zellpopulationen, welche ihre funktionellen Eigenschaften auch über längere Kultur- und Passagezeiträume hinweg behalten. Das rasche Zellwachstum führt schnell zum Erreichen höherer Zelldichten, die nachweisbare Substanzmengen produzieren. Nachteilig hierbei ist jedoch die Tatsache, dass Osteosarkomzellen ein transformiertes Genom besitzen, und sich daher grundsätzlich in ihren physiologischen Eigenschaften von normalen Knochenzellen unterscheiden können. Hierunter fällt auch ein Verlust der Kontrolle des Zellwachstums. Die Eigenschaften einer Osteosarkomzelllinie, jeweils einen bestimmten osteoblastären Entwicklungs- und Differenzierungsgrad zu repräsentieren, kann aber auch nutzbringend in Untersuchungen angewandt werden, in denen gerade verschiedene osteoblastäre Reifungszustände miteinander verglichen werden sollen. Grundsätzlich sollten aber für in-vitro-Versuche als Knochenzellkulturmodell nur solche Zelllinien zur Anwendung kommen, bei denen der Differenzierungsgrad und der osteoblastäre Charakter hinreichend belegt sind (Schulz, 1995).

### **1.5.2 Osteoblastenkulturen**

Humane Osteoblastenkulturen stammen vielfach aus isolierter Knochenspongiosa von Spendern, die sich orthopädischen Knochenersatzoperationen unterziehen, z. B. aus trabekulärem Knochen des Caput femoris nach endoprothetischem Gelenkersatz. Die Gewinnung einer Knochenzellkultur aus dem Operationsmaterial wird von verschiedenen Autoren im Prinzip ähnlich beschrieben (Gundle und Beresfold, 1995, Robey und Termine, 1985). Nach mechanischer Zerkleinerung und Spülung der Spongiosafragmente erfolgt eine Kollagenasedissektion der Spongiosaoberfläche und die anschließende Abzentrifugation der Spongiosafragmente mit Aussaat in geeigneten sterilen Schalen. Ebenso werden die nach Kollagenasebehandlung abzentrifugierten Zellen in Kulturflaschen

ausgesät. Die derart gewonnenen Monolayerkulturen können weiter subkultiviert und für Stimulationsversuche genutzt werden.

Zudem gelang es im weiteren Verlauf, Präosteoblasten aus humanem Knochenmark zu isolieren, indem die Zellen in Medium kultiviert wurden, welches fetales Kälberserum enthielt. Nach ungefähr 14 Tagen und nachdem die Zellen die Konfluenz erreicht hatten (Monolayerkultur), wiesen sie osteoblastäre Eigenschaften auf (Rickard et al., 1996). Die auf diese Weise gewonnenen Zellen zeigen die charakteristischen Merkmale des osteoblastären Phänotyps in vitro wie die Produktion von alkalischer Phosphatase, der Anstieg des intrazellulären cAMP nach Parathormongabe, die Produktion von Osteocalcin nach Stimulation mit 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) sowie die variable Expression von Kollagen Typ I, Osteopontin und anderen Matrixproteinen (Johansen et al., 1992).

### **1.5.3 Chondrozytenkulturen**

Schon im 19. Jahrhundert beschrieb Prudden (1881) die kurzfristige Kultivierung von Kaninchen-Knorpel aus dem Femurkopf bzw. der Rippe in 0,5-prozentiger Kochsalzlösung bei 38 °C, bevor er das Gewebe in die Subkutis von Kaninchen transplantierte. Dort war der Knorpel teilweise noch nach Monaten nachweisbar.

Die Isolierung einzelner (embryonaler Knorpel-)Zellen zur Kultivierung in Monolayer-Form erfolgte zunächst durch Auswuchskulturen (Fischer, 1922), später durch den enzymatischen Andau mit Trypsin (Rinaldini, 1959). Die Purifikation der Clostridien-Kollagenase vor etwa 40 Jahren optimierte die Verdauung noch weiter, so dass zunächst Chondrozyten aus dem Nasenknorpel von Kälbern (Kawiak et al., 1956), dem Gelenkknorpel von Hunden (Smith, 1965), später aus der vergleichsweise festen artikulären Knorpelmatrix erwachsener Menschen gelöst und in Monolayer-Form kultiviert werden konnten (Green, 1971).

## 1.6 Differenzierung von Chondrozyten in der Monolayer-Zellkultur

Nach Verletzung besitzt Knorpelgewebe nur sehr beschränkte Reparaturmechanismen.

Aufgrund dessen ist die Behandlung dieser Defekte und die Wiederherstellung der Gelenkfunktion von enormer Bedeutung. Vor allem Defekte, die den subchondralen Knochen nicht durchdringen, heilen nicht ab und führen nach und nach zu einer Degeneration der Gelenkoberfläche. Viele verschiedene Behandlungsmethoden wurden in den letzten Jahrzehnten entwickelt, insbesondere die Allotransplantation von autologem Knorpelgewebe wird in den letzten Jahren intensiv erforscht und zunehmend klinisch eingesetzt (Czitrom et al., 1986, Brittberg et al., 1994).

Ein großes Problem stellt die Gewinnung einer ausreichenden Menge autologer Chondrozyten dar. Eine Möglichkeit zur Vervielfältigung der Chondrozyten besteht in der Kultivierung in so genannten Monolayerkulturen. Der adulte Chondrozyt besitzt in vivo kaum Teilungsfähigkeit, die isolierten Chondrozyten können in vitro jedoch erneut proliferieren. Doch schon früh zeigte sich das Problem der Dedifferenzierung. Die Chondrozyten werden „fibroblastenartig“, sie verlieren ihren runden Phänotyp, werden zunehmend spindelförmig und erlangen die Fähigkeit zur Zellteilung wieder (Sittinger et al., 1997, Elima und Vuorio, 1989). Auch die Kollagenproduktion ändert sich fundamental: Während Chondrozyten in vivo vorwiegend die Kollagentypen II, IX und XI produzieren, findet man bei den in der Monolayerkultur kultivierten Chondrozyten überwiegend die Expression von Kollagen I, III und V (Mayne et al., 1976, Benya et al., 1977 und 1978, von der Mark et al., 1977). Wurden diese dedifferenzierten Zellen nun Nacktmäusen intramuskulär injiziert, so waren sie nicht in der Lage, stabiles Knorpelgewebe zu induzieren (Dell'Accio et al, 2001).

Die Ursache hierfür liegt sicherlich in den im Vergleich zur in vivo Situation völlig differenten Umgebungsbedingungen: In vitro bildet sich keine extrazelluläre Matrix. Demzufolge können wichtige Interaktionen zwischen den Chondrozyten bzw. zwischen der Zelle und der extrazellulären Matrix nicht stattfinden.

Aufgrund dieser Problematik wurde schon früh nach Möglichkeiten gesucht, diese Dedifferenzierungsvorgänge zu verhindern, bzw. eine Redifferenzierung zu induzieren.

Eine Möglichkeit besteht in der Kultivierung der Chondrozyten in dreidimensionalen Kulturen mit Hilfe von Kollagen-, Agarose oder Alginat-Gelen.

1982 wurde erstmalig eine Redifferenzierung von Kaninchenchondrozyten nach einer Kultivierungszeit von 2 Wochen im Agarosegel beschrieben (Benja und Shaffer, 1982). Auch für humane Chondrozyten konnte dies nachgewiesen werden (Aulthouse et al., 1989).

Für die Alginatkultur gilt ähnliches. Alginat ist ein lineares Copolymer aus  $\beta$ -D-Mannuronsäure, welches aus Braunalgen gewonnen wird. Es konnte gezeigt werden, dass unter diesen dreidimensionalen Kulturbedingungen eine Re-Expression chondrozytenspezifischer Oberflächenmarker und Matrixproteine (wie z.B. Kollagen II) zu detektieren ist. Der für Chondrozyten typische rundliche Phänotyp bleibt über Monate bestehen (Benja und Shaffer, 1982, Bonaventure et al., 1994, Hauselmann et al., 1994). In späteren Versuchen wurde die Stabilität der im Alginat redifferenzierten Chondrozyten in vivo untersucht. Im Gegensatz zu Chondrozyten aus Monolayerkulturen war nach Injektion bzw. Implantation der redifferenzierten Chondrozyten in Nacktmäuse Knorpelgewebe mit histologischem Nachweis von Glycosaminoglykan und knorpelspezifischen Kollagenen in vivo nachweisbar (Paige et al., 1996).

Außerdem bietet die Alginatkultur gegenüber anderen 3-D-Matrices (z.B. Agarose) den Vorteil, dass das Alginatgel mit Hilfe von Calciumchelatoren (EDTA, Na-Citrat) leicht verflüssigt werden kann. Die Chondrozyten können nachfolgend durch Zentrifugation leicht abgetrennt werden.

## **1.7 Cbfa1**

Cbfa1 (Core-Binding-Factor 1), auch bekannt als Am13 und Runx2, ist Mitglied der Runt-Domain Familie und wurde als Transkriptionsfaktor 1997 erstmalig beschrieben (Ducy et al., 1997). Bei Vertebraten sind drei dieser so genannten Runx-Gene bekannt:

Runx1, auch bekannt als AML1 bzw. Cbfa2, wurde identifiziert durch seine Beteiligung an Leukämie-assoziierten Translokationen. Bei Runx1-Knockout-Mäusen kommt es zu einer völligen Blockierung der Haematopoese in der fetalen Leber als Zeichen der zentralen Rolle dieses Gens bei der Knochenmarks- und Erythrozytendifferenzierung (Okuda et al., 1996). Auch im Knorpelgewebe wird Runx1/ Cbfa2 exprimiert (Levanon et al., 2001). Da Runx1<sup>+/+</sup>-/-/-Mäuse einen

identischen Phänotypen wie Runx2-defiziente Mäuse zeigen, scheint Runx1 bei der Knorpelentwicklung eine eher untergeordnete Funktion zu spielen (Yoshida et al., 2004).

Die Funktion des Runx3-Gens ist bisher noch weitestgehend unbekannt. Es scheint bei der Differenzierung von Epithelzellen im Rahm der Gastritis und während der neuronalen Entwicklung eine Rolle zu spielen, wird aber ebenfalls in Knorpel exprimiert (Inoue et al., 2002, Li et al., 2002, Stricker et al., 2002).

Bei der autosomal dominant vererbten Cleidocranialen Dysplasie war 1997 erstmalig eine heterozygote Mutation des Cbfa1 Gens nachgewiesen worden (Mundlos et al., 1997).

Diese genetisch determinierte Erkrankung ist charakterisiert durch eine Hypoplasie/Aplasie der Clavikel, offene Fontanellen, überzählige Zähne und weitere Veränderungen in Bezug auf Skelettstruktur und -wachstum.

Homozygotes Cbfa1-knock-out an der Maus führte bei ungestörter Weichgewebs- und Knorpelbildung zu einem vollständigem Fehlen reifer Osteoblasten, während vereinzelt unreife Vorstufen mit geringer alkalischer Phosphataseaktivität, aber ohne Expression von Osteopontin und Osteocalcin nachweisbar waren (Otto et al., 1997).

Diese Daten dokumentierten bereits die essentielle Bedeutung dieses Transkriptionsfaktors für die Knochenentwicklung. Spätere Untersuchungen konnten mehr Aufschluss über die intrazellulären Interaktionen von Cbfa1 geben: Sowohl Osteopontin als auch Osteocalcin besitzen Promotorregionen mit Bindungsstellen für Cbfa1 (Harada et al., 2000).

Im Rahmen der embryonalen Entwicklung wird Cbfa1 zunächst von den mesenchymalen Zellen exprimiert. Diese bilden später das Skelettsystem, unabhängig von der Ossifikationsart (enchondral/intramembranös). Die Expression dieses Transkriptionsfaktors identifiziert diese Zellen als Chondro-Osteoprogenitorzellen (Ducy et al., 1997).

Bei Chondrozyten scheint die Cbfa1-Expression auf die praehypertrophe und hypertrophe Form beschränkt zu sein (Takeda et al., 2001, Rabie et al., 2004). Bei Cbfa1-Knockout-Mäusen fehlen diese Chondrozytenformen im Bereich von Femur und Humerus (Inada et al., 1999, Kim et al., 1999). Es ist daher davon auszugehen, dass dieser Transkriptionsfaktor diesen Schritt entscheidend beeinflusst (Rabie et al., 2004).

Zur besseren Unterscheidung der unterschiedlichen Wirkungsmechanismen dieses Transkriptionsfaktors in der Osteoblastendifferenzierung zum einen, und zum anderen in der Entwicklung hypertropher Chondrozyten wurde ein Mausmodell konzipiert, in dem Cbfa1 isoliert in Chondrozyten überexprimiert wurde (Takeda et al., 2001, Ueta et al., 2001). Hier fand sich eine deutlich beschleunigte enchondrale Ossifikation. Durch die Überexpression von Cbfa1 in Chondrozyten in der Cbfa1-knockout-Maus konnten die Anomalien zu einem gewissen Teil rückgängig gemacht werden: In Humerus und Femur konnten wieder hypertrophe Chondrozyten nachgewiesen werden, die den für die Gefäßbildung wichtigen Wachstumsfaktor VEGF (vascular endothelial growth factor) exprimierten. Ebenso kam es zur in der enchondralen Ossifikation wichtigen Gefäßeinsprossung in die von den hypertrophierten Chondrozyten gebildete Matrix und zur Ausbildung von Osteoclasten und Chondroclasten. Es konnten jedoch weiterhin keine differenzierten Osteoblasten nachgewiesen werden. Ebenso wenig kam es zur Ausbildung von Knochenmatrix.

In Bezug auf den permanenten Knorpel (wie z.B. Gelenkknorpel, die Trachealspangen, das Nasenseptum oder die Bandscheiben) führte die Überexpression interessanterweise ebenfalls zu Veränderungen: Es waren auch hier hyperthrophierte Chondrozyten nachweisbar, einige Regionen wurden völlig durch Knochensubstanz ersetzt.

Ein zweites Mausmodell wurde diesem gegenübergestellt mit einer isolierten Überexpression der dominant negativen Form des Cbfa1 im Chondrozyten. Wie erwartet fanden sich hier überwiegend Zellen, die phänotypisch permanentem Knorpel entsprechen. Die enchondrale Ossifikation wurde inhibiert.

Dies verdeutlicht die beiden wichtigen Aufgaben des Cbfa1, zum einen im Rahmen der Differenzierung von mesenchymalen Progenitorzellen in Osteoblasten, zum anderen in der Entwicklung hypertropher Chondrozyten, die wiederum die Grundlage bilden für die nachfolgende Invasion von Osteoblasten und für den Aufbau einer knochenspezifischen Matrix. Auch in vitro Untersuchungen mit isolierten Hühnerchondrozyten bestätigten die wichtige Rolle von Cbfa1 im Hinblick auf die Differenzierung hypertropher Chondrozyten (Enomoto-Iwamoto et al., 2001). Eine Überexpression von Cbfa1 führte zu deutlich erhöhter Aktivität der alkalischen Phosphatase und zu einer Expression des, bei hypertrophen Chondrozyten typischen, Kollagens Typ X. Gleichzeitig kam es zu einer vermehrten Kalzifizierung

der extrazellulären Matrix. Wurde nun im Gegensatz dazu durch die Expression einer dominant negativen Form des Cbfa1 dieser Transkriptionsfaktor blockiert, so führte dies zu einer deutlich verminderten Aktivität der alkalischen Phosphatase. Die typische Matrixkalzifizierung wurde inhibiert.

Neuere Daten geben Aufschluss über intrazelluläre Mechanismen dieser Phänomene: Cbfa1 scheint zusammen mit BMP 2 (bone morphogenetic protein 2) durch direkte Interaktion mit der Promotorregion von Kollagen Typ X eine vermehrte Expression dieses Kollagens zu induzieren (Drissi et al., 2003).

Dass diese Cbfa1-vermittelte Kollagen Typ X-Expression auch im adulten Gelenkknorpel eine Rolle spielen kann, legt eine Arbeit von van Lam und Rabie aus dem Jahre 2005 nahe. Hier konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass eine vermehrte mechanische Beanspruchung von Rattenkiefergelenken zu einem Anstieg der Expression von Cbfa1 und Kollagen Typ X führt (van Lam und Rabie, 2005).

Weiterhin konnte im osteoarthritisch veränderten - im Vergleich zu gesundem Knorpel eine vermehrte Cbfa1-Expression nachgewiesen werden (Wang et al., 2004). Folge hiervon könnte eine Cbfa1-induzierte Aktivierung der Matrix Metalloproteinase 13 (MMP 13) sein. Hierbei handelt es sich um ein proteolytisches Protein, welches von hypertrophierten Chondrozyten im Rahmen der enchondralen Ossifikation vermehrt sezerniert wird, aber auch bei arthrotisch/-itisch verändertem Gelenkknorpel in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden kann (Wang et al., 2004, Pei et al., 2006).

## 2. Fragestellung

Chondrozyten sind in entscheidendem Maße abhängig von der extrazellulären Matrix. In gesundem Gelenkknorpel bleiben sie phänotypisch stabil und zeigen keine wesentlichen Differenzierungsvorgänge. Entzündliche, traumatische oder degenerativ bedingte Veränderungen der extrazellulären Matrix führen hingegen zu deutlich veränderten Umgebungsbedingungen der Chondrozyten. Hierdurch kommt es zu Änderungen sowohl im Phänotyp als auch im Expressionsverhalten knorpeltypischer Matrixproteine: Die Chondrozyten hypertrophieren, es findet sich ein verändertes Kollagen-Expressionsmuster (verminderte Expression des knorpeltypischen Kollagens Typ II, Expression von Kollagen Typ X, Kollagen Typ I und alkalischer Phosphatase). Hier zeigen sich Parallelen zu den hypertrophierten Chondrozyten im Rahmen der enchondralen Ossifikation.

Ein zentrales Gen bei der Knochenentwicklung und der Differenzierung von hypertrophierten Chondrozyten ist der Core-Binding-Factor 1 (Cbfa1). Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, das Expressionsverhalten des für Knochen- und Knorpelwachstum essentiellen Transkriptionsfaktors Cbfa1 im Modell der Knorpelzellkultur unter verschiedenen Einflüssen und in unterschiedlichen Differenzierungsstadien zu analysieren.

Im Einzelnen ging es um folgende Fragen:

1. Wie unterscheidet sich das Expressionsverhalten von Cbfa1 in kultivierten Osteoblasten, Osteozyten, Osteosarkomzelllinien und Chondrozyten?
2. Führt die Kultivierung von Chondrozyten in der konventionellen Monolayerkultur zu einer Veränderung der Cbfa1-Expression?
3. Korreliert diese Veränderung der Cbfa1-Expression mit den phänotypischen Veränderungen der Chondrozyten in der Monolayerkultur und ist diese abhängig von der Zellpassage?



4. Bestehen Unterschiede der Cbfa1-Expression in Abhängigkeit von der extrazellulären Umgebung (Monolayerkultur versus dreidimensionale Alginatkultur) ?
5. Sind diese Änderungen der Cbfa1 Expression reversibel nach Überführung der Zellen in ein dreidimensionales Kultursystem?

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Zellkultur**

##### **3.1.1 Gewinnung der Knochenfragmente**

Humane Osteoblasten wurden aus humanen Hüft- und Kniegelenken gewonnen, die im Rahmen einer Endoprothesenoperation in der Orthopädischen Klinik der Justus Liebig Universität Giessen explantiert wurden. Es lag das Einverständnis der Patienten für die wissenschaftliche Verwendung des Knorpels („informed consent“) vor. Je nach Möglichkeit wurden die Gelenkexplantate entweder sofort verarbeitet, oder bis maximal 24 Stunden in Ham`s F 12 K Medium +10 % FCS bei 4°C aufbewahrt.

Vor der eigentlichen Isolierung der verschiedenen Knochenzellen wurden die operativ gewonnenen Knochenstücke zunächst mechanisch aufbereitet. Hierzu wurde der Knochen in einen mit Ham`s F 12 K Medium oder Hank`s Puffer gefüllten Behälter überführt. Die Spongiosa wurde mit Hilfe eines scharfen Löffels von der Kompakta und dem Bindegewebe befreit und nachfolgend in eine ebenfalls mit Ham`s F 12 K Medium oder Hank`s Puffer gefüllte Zellkulturschale überführt und bis auf eine Fragmentgröße 1x1x1mm mittels einer Schere zerkleinert. Die Isolierung der Zellen erfolgte in einem eigenen hierfür in Anlehnung an Robey und Termine entwickelten Mehrschrittverfahren (Robey und Termine, 1985, Battmann et al., 1997, Hinrichs et al., 1993).

##### **3.1.2 Gewinnung von Knochenmarkstammzellen (Präosteoblasten)**

Die Knochenfragmente wurden mehrmals mit Ham`s F 12 K Medium gespült und die Spülflüssigkeit in ein 60 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) überführt. Nach dem Abzentrifugieren (10 min bei 1500 U/min) wurde der Überstand, der Erythrozyten und Adipozyten enthielt, dekantiert und das Pellet mit Ham`s F 12 K Medium + 10 % FCS + 100 U/l Penicillin + 100 U/l Streptomycin resuspendiert. Anschließend wurde es in eine 120 ml Kulturflasche überführt. Die Zellsuspension wurde unter 37° C, 95 % Luft und 5 % CO<sub>2</sub> im Begasungsschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) kultiviert.

Alle 5 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Die Kontrolle, ob die Zellen bereits adhären erfolgte unter dem Phasenkontrastmikroskop.

### **3.1.3 Gewinnung von „Collagenase Released“ (aktiven) Osteoblasten**

Die vorbereiteten Knochenstücke wurden in einen sterilisierten, mit 40 ml Ham's F 12 K Medium und einem Magnetrührstäbchen gefüllten, 50 ml Erlenmeyerkolben überführt. Hinzu wurde sterilfiltriert über einen Membranfilter (Porengröße 0,2 µm) 25 mg (250 U/ml) Kollagenase Typ IV (Sigma Diagnostics, Montana, USA) in 10 ml Medium gegeben. Der Kolben wurde verschlossen und bei einer Temperatur von 37 °C 2,5 Stunden lang mit 500-700 U/min gerührt. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig in ein Zentrifugenröhrchen überführt und dieselbe Prozedur zur Kultivierung der Zellen wie in 3.1.2 wiederholt.

### **3.1.4 Aussaat der Knochenfragmente - „Treated Explants“ (Osteozyten)**

Die mittlerweile von der Kollagenaselösung freien Knochenfragmente wurden mit Medium gespült und in eine Petrischale mit Ham's F 12 K Medium + 10 % FCS + 100 U/I Penicillin + 100 U/I Streptomycin ausgesät und im Brutschrank gehalten. Das Medium wurde alle 5 Tage erneuert.

### **3.1.5 Kultivierung und Passagierung**

Der Mediumwechsel wurde wie oben beschrieben wiederholt, bis die Zellen in den Flaschen bzw. Petrischalen das Stadium der Konfluenz erreicht hatten. Dann wurden sie abtrypsinisiert und in neue Flaschen passagiert.

### **3.1.6 Osteosarkomzelllinien**

Die Isolierung und Etablierung von humanen Osteosarkomzelllinien aus dem Tumorgewebe erfolgte nach Spülung, Gewebedissektion, enzymatischer Zellseparation und Zentrifugation ähnlich wie bei den Osteoblasten. Man erhält durch Subkultivierung homogene Zellpopulationen, die ihre Differenzierung über längere Kultur- und Passagezeiträume beibehalten. Sie eignen sich daher als ein

Zellkulturmodell der osteoblastären Zellreihe. Nachteilig ist, dass Osteosarkomzellen ein transformiertes Genom besitzen und sich dadurch grundsätzlich von normalen Knochenzellen unterscheiden. Dies betrifft auch die Kontrolle des Zellwachstums. Daher wurden nachfolgend nur Zelllinien eingesetzt, bei denen der Differenzierungsgrad und der osteoblastäre Charakter hinreichend belegt ist (Schulz, 1995).

Verwendet wurden folgende Osteosarkomzelllinien:

#### SaOS-2

Die humane Osteosarkomzelllinie SaOS-2 wurde von der Zellbank ATTC (American Tissue Collection, Rockville, MD, USA) bezogen und stammt von dem Osteosarkom eines 11-jährigen Mädchens.

#### HOS 58

Die humane Osteosarkomzelllinie HOS 58 wurde im Institut für Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen etabliert und stammt von dem Osteosarkom eines 21-jährigen Mannes.

Teile des Tumors wurden nach Heterotransplantation auf athymische Mäuse subkultiviert und in Monolayerkulturen etabliert (Kern et al., 1990, Schulz et al., 1993). Der Differenzierungsprozess dieser Zelllinie wurde ausführlich untersucht (Siggelkow et al., 1998).

#### MG 63

Die humane Osteosarkomzelllinie MG 63 (Quelle ATTC) stammt von dem Osteosarkom eines 14-jährigen Jungen.

Zum Anzüchten der benötigten Zellmenge wurden die bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in Cryotubes (Fa. Nunc) eingefrorenen Zelllinien in einem Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut, sofort in ein 60ml Zentrifugenröhrchen (Fa. Greiner) gegeben und mit 40ml Kulturmedium aufgefüllt, um Zellschädigungen durch das Einfriermedium DMSO zu vermeiden. Anschließend wurde bei 1500 U/min 10min zentrifugiert, der Überstand abgegossen und der gleiche Vorgang wiederholt. Zur Resuspendierung wurden am Ende 50ml

Kulturmedium hinzugegeben und der Inhalt des Zentrifugenröhrchens in eine Zellkulturschale überführt.

Alle Kulturschalen wurden in einem Begasungsbrutschrank (Fa.Heraeus) bei 37°C, 95% Luft und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Für alle Osteosarkomzelllinien wurde zur Erreichung gleicher Kulturbedingungen RPMI-Medium (Fa.Biochrom) + 5% fetales Kälberseum (FCS, Fa Gibco) verwendet. Medienwechsel und die mikroskopische Kontrolle der Kulturen erfolgte alle drei Tage. Zum Passagieren wurde das Kulturmedium steril abgesaugt, die Zellen mit Hank`s Puffer gespült und anschließend 15 Minuten unter Zugabe von 15ml Trypsin-/EDTA Lösung (Fa.Biochrom) im Brutschrank inkubiert. Um alle Zellen zu separieren wurde die Suspension mehrfach durch die Pipette gespült, der Erfolg wurde mikroskopisch kontrolliert. Nach dem Ausdünnen der Zellen wurden sie unter gleichen Kulturbedingungen wieder inkubiert.

### **3.1.7 Isolation von humanen Knorpelzellen und Kultivierung in der Monolayerkultur**

Humane Chondrozyten wurden aus hyalinem Gelenkknorpel von humanen Hüft- und Kniegelenken gewonnen, die im Rahmen einer Endoprothesenoperation in der orthopädischen Klinik der Justus Liebig Universität Giessen explantiert wurden. Explantate von Patienten mit inflammatorischen Gelenkerkrankungen wurden von der Untersuchung ausgeschlossen.

Die Präparate wurden steril gewaschen und makroskopisch gesunde Areale wurden abpräpariert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass kein subchondrales Knochengewebe mitentfernt wurde. Im weiteren Verlauf wurden die exzidierten Knorpelstücke in ca. 2 mm<sup>3</sup> große Würfel zerkleinert und in einer steriltrierten Lösung bestehend aus 20 mg Collagenase (0,8 mg/ml Sigma Cat. No. C9407), 2,5 mg Desoxyribonuklease (0,1 mg/ml Sigma Cat. No. D5025) für ca. 4 Std. bei 37°C inkubiert auf einem Rührer mit ca. 600 U/min (Brittberg 1996 „Cartilage Repair“ S 37f). Danach wurde die Suspension im Zentrifugenröhrchen bei 800 U/min. für 10 Minuten abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden in Hanks-Lösung resuspendiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt.

Danach erfolgte die Resuspensierung mit 15ml DMEM/Hamm`s F 12 K mit 10% FKS, Penicillin/Streptomycin und 50µg/ml L-Ascorbinsäure. Die Zahl der Chondrozyten wurde mittels Durchflussszytometer bestimmt. Ca. 2 Millionen Zellen

wurden in eine Zellkulturflasche (BD Falcon) überführt. Die Zellen wurden dann im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gelagert. Der Mediumwechsel erfolgte ca. alle 2-3 Tage. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit 0,05% Trypsin-EDTA (Gibco) trypsinisiert, passagiert und weiterkultiviert.

### **3.1.8 In vitro Inkubation in der Alginatkultur**

Die Alginat-Lösung bestehend aus 100ml Ham's F12 (Biochrom AG) und 1,5g low viscosity Alginat (Sigma) wurde zunächst für ca. ½ Std. bei 37°C und 600 U/ml auf dem Rührer gelöst und nachfolgend autoklaviert.

Die mehrmals gewaschenen und zuvor gezählten Zellen wurden dann abzentrifugiert und das Zellpellet mit der entsprechenden Menge Alginatlösung resuspendiert. Die Zieldichte betrug  $1 \times 10^6$  Zellen/ml Alginatlösung.

Dieses Zell/Alginat-Suspensat wurde dann vorsichtig mit einer 18G-Kanüle in einer Spritze aufgezogen und nachfolgend durch eine 22G-Kanüle in eine Lösung bestehend aus zuvor sterilfiltrierter 102mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung getropft. Die hierbei entstandenen Kügelchen mit einem Volumen von ca. 11 µl wurden in der Lösung für 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert, um die Polymerisation des Alginats zu induzieren. Danach wurden die Alginatkugeln dreimal in einer Hanks-Lösung gewaschen und anschließend in einer 24-Lochplatte mit ca. 1ml DMEM/Hamm's F 12 K mit 10 % FKS, Penicillin/Streptomycin und 50µg/ml L-Ascorbinsäure/well mit einer Dichte von 9 Alginatkugeln/well kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle 2 Tage gewechselt.

## **3.2 Zellzählung der Zellen**

Vor der Wiederaussaat bzw. der RNA-Isolierung erfolgte die Messung der Zellzahl mit einem Coulter Counter Feinpartikelzähler (Fa. Coulter Electronics Ltd. Luton UK). Das Messprinzip besteht in der Erzeugung einer kurzen Widerstandsänderung im Stromfluß zwischen der in der Messkammer eingetauchten Anode (Metallplättchen) und der Kathode (Glaselektrode), welche durch einen definierten Flüssigkeitsstrom die Zellen ansaugt. Über Impulshöhe oder Impulsanzahl während der Zählzeit kann auf die Größe und die Anzahl der zu messenden Partikel geschlossen werden, die auf dem Coulter Counter Feinpartikelzähler graphisch dargestellt werden.

Die zu zählenden Zellkulturen wurden nach Trypsinierung zentrifugiert und in einer bestimmten Menge Zellkulturmedium resuspendiert, wobei durch mehrfaches Aufsaugen und Ausspülen der Zellen eine gute Zellseparation erreicht werden sollte. Je nach Verdünnung wurden geringe Mengen abpipettiert und in einem mit Isoton II-Elektrolytlösung gefüllten Probengefäß (beides Fa. Coulter) zugeführt. Nach dreimaliger Auszählung von 500 µl wurde die mittlere Zellkonzentration pro ml Probenvolumen bestimmt und somit die Gesamtzahl der Zellen in der Mediumsuspension berechnet.

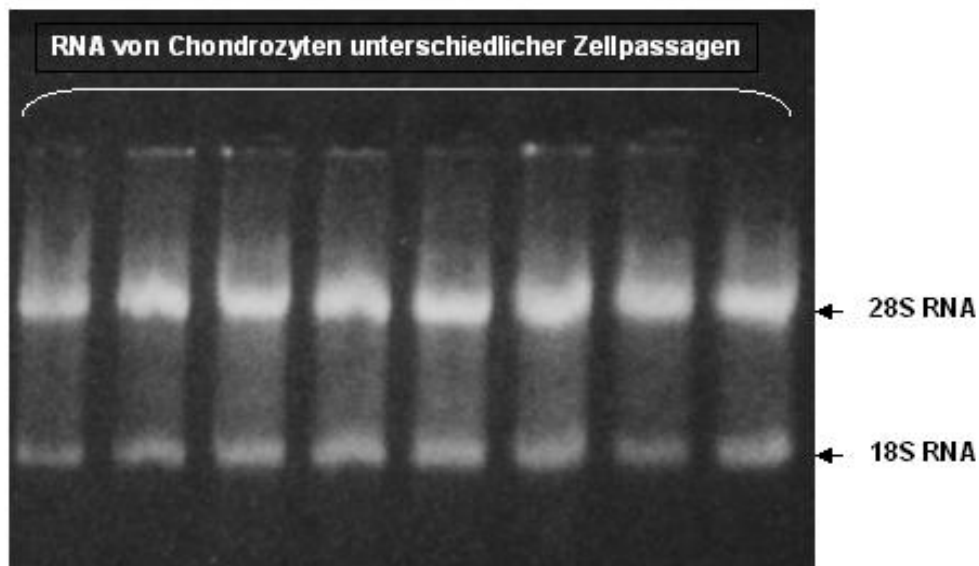
### **3.3 RNA-Isolierung/PCR**

#### **3.3.1 RNA-Extraktion**

Die RNA-Extraktion (Gesamt-RNA) erfolgte mit Hilfe des RNAeasy Kits der Firma Qiagen (Santa Clarita CA). Hierbei wurde die RNA mit einem Guanidin-Isothiocyanat Puffer lysiert und homogenisiert, anschließend an eine Membran aus Silikagel gebunden, gewaschen und mit H<sub>2</sub>O eluiert. Als Lysepuffer wurde der Puffer RLT (FA Qiagen) verwendet.

Die extrahierte RNA wurde entweder sofort bei -70°C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet. Zur Kontrolle der Qualität der isolierten RNA wurden Aliquots der isolierten RNA mittels Gel-Elektrophorese auf ihre Integrität untersucht. Cytoplasmatische RNA eukaryotischer Zellen enthält ca. 95 % rRNA, zusammengesetzt aus 28S, 18S, 5.6S und 5S RNA. Bei guten RNA-Präparationen laufen 28S (5.1 kb) und 18S (1.9kb) als zwei scharfe, getrennte Banden und dienen als interne Marker für die Integrität der isolierten RNA.

Abbildung 3.3.1 zeigt exemplarisch die RNA-Elektrophorese frisch extrahierter RNA von Chondrozyten unterschiedlicher Zellpassagen mit deutlich sichtbaren 28S und 18S Banden.



**Abb. 3.3.1:** RNA-Elektrophorese frisch extrahierter RNA von Chondrozyten unterschiedlicher Zellpassagen

### 3.3.2 Reinigung der gesamt RNA-Präparation von genomischer DNA

Um Aussagen über quantitative Veränderungen der RNA-Expression machen zu können, mussten zuvor mögliche Fehlerquellen bedacht werden. Ein Problem bestand in der unterschiedlichen Ausgangskonzentration der zu vergleichenden Proben. Um diesen Fehler zu minimieren, wurden die Zellen vor der RNA-Isolation gezählt. Zudem wurde im Rahmen der Realtime-PCR das zu untersuchende Gen mit einem so genannten Housekeeping-Gen verglichen. Housekeeping-Gene sollten idealerweise konstant exprimiert werden unabhängig von der Art des Gewebes und dem individuellen Differenzierungsgrad. Hierdurch können Rückschlüsse auf die Zellzahl gezogen werden. Für unsere Versuche verwendeten wir das HPRT-Gen. Das Enzym Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) spielt eine wichtige Rolle im Purinstoffwechsel und wird aufgrund seiner relativ konstanten Expression als Housekeeping-Gen benutzt (Pernas-Alonso et al., 1999). Wie bei anderen Housekeeping-Genen (z.B. GABDH), existieren jedoch auch bei dem HPRT-Gen



Pseudogene, die das Ergebnis verfälschen können, falls die mRNA-Probe mit genomischer DNA verunreinigt ist (Sellner und Turbett, 1996).

Zur Eliminierung genomischer DNA-Verunreinigungen wurde daher die extrahierte RNA vor der reversen Transkription mit RNase freier DNase I (Qiagen) inkubiert.

### **3.3.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)**

Die RT-PCR dient dem Nachweis der Transkription eines Gens, also dem Vorhandensein einer spezifischen mRNA. Dazu wird zunächst mit einer reversen Transkriptase ein zur mRNA komplementärer DNA-Strang synthetisiert und anschließend eine Standard-PCR durchgeführt.

In unserer Versuchsreihe wurde jeweils 3 µg der isolierten RNA bei 70 °C für 10 Minuten erhitzt (Touchdown PCR-Gerät) und anschließend für 5 Minuten auf Eis gekühlt.

In der Zwischenzeit wurde der Mastermix hergestellt:

RT-PCR-Mastermix für eine Probe:	7,5µl Aqua bidest
	4,0µl MgCl <sub>2</sub> (5mMol) (Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland)
	2,0µl 10xPCR-Puffer II (Perkin Elmer)
	1,0µl dNTP (jedes 10mMol) (Eurobio, Raunheim, Deutschland)
	1,0µl Random Hexamer Primer (50µMol) (Perkin Elmer)
	0,5µl (10U) Rnase-Inhibitor (Perkin Elmer)
	1,0µl (50U) MULV Reverse Transkriptase (Perkin Elmer)

Der Mastermix wurde der RNA hinzugefügt und die Probe bei 20 °C für 10 Minuten und 43 °C für 60 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde nachfolgend gestoppt durch Erhitzen der Proben auf 99 °C für 5 Minuten.

Kontrollreaktionen zur Identifizierung von DNA-Kontamination bzw. falsch positiven Banden wurden durchgeführt, indem Proben ohne Reverse Transkriptase bzw. Aqua bidest bei der RT-PCR eingesetzt wurden.

Die so gewonnene cDNA wurde anschließend entweder bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (bei Lagerung länger als drei Tage bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) eingefroren oder sofort weiterverarbeitet.

### **3.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Diese Methode ermöglicht den Nachweis kleinster Mengen von bestimmten DNA-Abschnitten durch gezielte exponentielle Vervielfältigung dieser DNA-Fragmente. Das Prinzip besteht in der zyklischen Wiederholung (25-40x) der folgenden drei Einzelschritte:

1. Denaturierung:

Die DNA-Doppelstränge zerfallen bei  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  in die beiden komplementären Einzelstränge.

2. Ankopplung:

cDNA-spezifische Oligonukleotide („Primer“) lagern sich an die komplementäre cDNA an.

3. Verlängerung:

Verlängerung des Primer/cDNA-Hybrids vom 3'-Ende her durch eine DNA-Polymerase. Die Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* ("Taq-Polymerase") ermöglicht die automatisierte Wiederholung dieser drei Einzelschritte in einem Thermocycler, ohne jeweils nach dem Denaturieren wieder neues Enzym zusetzen zu müssen.

Mit jedem Durchlauf dieser drei Schritte verdoppelt sich theoretisch die Anzahl der Genfragmente, wenn die Reaktionseffizienz der PCR bei eins läge.

Die Nukleotidsequenz der einzelnen Primer wird an Hand der publizierten Sequenzen des Zielgens ausgewählt. Dabei gilt ein hoher Prozentsatz an GC-Basenpaarung zwischen Primer und dem komplementären cDNA-Fragment wegen der größeren Anzahl an möglichen Wasserstoffbrückenbindungen als günstig.

Oligonukleotide (Primer) (FA MWG Biotech AG, Ebersberg, Germany)

Die Sequenzen und Länge der amplifizierten PCR Produkte betrugen:

#### **HPRT**

Forward: 5'- AAG GAC CCC ACG AAG TGT TG - 3'

Reverse: 5'- GGC TTT GTA TTT TGC TTT TCC A - 3'

#### **Cbfa1**

Forward: 5'- AGA TTT GTG GGC CGG AGT G - 3'

Reverse: 5'- GGC GGT CAG AGA ACA AAC TAG G - 3'

Die zuvor in der Reversen Transkription hergestellte cDNA wurde auf Eis gegeben und nachfolgend wurde der PCR-Mastermix hergestellt.

PCR-Mastermix für eine Probe: 4,0 µl cDNA Eurobio

39,2 µl Aqua bidest Braun

4,0 µl 10x Puffer I mit MgCl<sub>2</sub> Perkin Elmer

0,5 µl dNTP (jedes 10mMol) Eurobio

1,0 µl Forward Primer 20pmol/µl, MWG Biotech AG

1,0 µl Reverse Primer 20pmol/µl, MWG Biotech AG

0,3 µl Ampli-Taq (5U/µl) Perkin Elmer

Nach initialer Denaturierung der cDNA Vorlage für 5 Minuten bei 94 °C wurden 40 Zyklen, bestehend aus 60 Sekunden 94 °C, 60 Sekunden Primeranlagerung bei 58 °C, und 60 Sekunden bei 72°C Kettenverlängerung, durchgeführt.

Die PCR-Reaktionen wurden mit dem Thermocycler Touchdown der Firma ThermoHybaid durchgeführt.

### **3.3.5 Herstellen des Agarose-Gels / Durchführung der Gel-Elektrophorese**

Zur Herstellung eines 2-prozentigen Agarose-Gels wurde ca. 1 g Agarose (MBI Fermentas) mit 50 ml TBS-Puffer vermischt und für ca. 2 Minuten bei 600W in der Mikrowelle gekocht.

Anschließend wurde 1,5 µl Ethidium-Bromid untergerührt. Nach einer kurzen Abkühlungsphase wurde dann das Gel in die Gelkammer (Fa. Bächler Tech) gegossen.

Nach Aushärtung des Gels wurde dann jeweils 8 µl Laufpuffer zu 2 µl des PCR-Produktes gegeben und in die Geltaschen gefüllt.

### **3.3.6 Real-Time-PCR**

Die Real-Time-PCR ermöglicht eine gleichzeitige Amplifikation und quantitative Nachweisbarkeit des PCR-Produktes. Dies bietet im Vergleich zur qualitativen PCR wesentliche Vorteile: Zum einen können exakte Angaben über die Menge des Ausgangsmaterials gemacht bzw. errechnet werden; zum anderen ist die Gefahr der Carry-Over Kontamination reduziert. Bei der TaqMan<sup>TM</sup> PCR wird eine spezielle fluorogene Sonde (ein Oligonukleotid, eine Art Primer) eingesetzt, deren 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (6-Carboxy-Fluorescein, FAM) markiert ist. Dieser Farbstoff vermittelt dem TaqMan, wie viel cDNA quantitativ vorliegt. Das 3'-Ende besitzt hingegen einen Quencher-Farbstoff (6-Carboxytetramethylrhodamin, TAMRA) und ist durch einen Phosphatrest blockiert, der die Extension des 3'-Endes während der Elongationsphase verhindert. Bei Anregung der intakten Sonde mit einer spezifischen Wellenlänge von 488 nm wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs - aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher-Farbstoff - durch einen Fluoreszenz-Energie-Transfer (FET) supprimiert; somit wird lediglich die Fluoreszenz des Quenchers mit einer charakteristischen Wellenlänge von 582nm emittiert. Während der Annealing-Phase der PCR hybridisieren die Sonde sowie die Primer an den Matrizen-Strang. Bezogen auf den Ausgangs-(ds)DNA-Strang eines jeden Zyklus liegt die Sonde zwischen den beiden Primern. Bei der Elongation trifft die Taq-Polymerase auf die Sonde und beginnt, sie zu verdrängen; durch Bildung einer Y-förmigen Sekundärstruktur wird die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der AmpliTaq Gold<sup>TM</sup> DNA-Polymerase aktiviert, was zum Zerschneiden der Sonde führt. Im

Gegensatz dazu erfolgt keine Spaltung der freien, nichthybridisierten Sonde, da nicht optimal bindende Sondenmoleküle verdrängt werden, bevor die Exonukleaseaktivität des Enzyms aktiviert wird. Aufgrund der Sondenhydrolyse wird die räumliche Nähe und zwangsläufig auch der Fluoreszenz-Energie-Transfer zwischen dem Reporter und dem Quencher unterbrochen, so daß das Reportersignal (Emission bei einer Wellenlänge von 518 nm) proportional zur Akkumulation des PCR-Produktes mit jedem PCR-Zyklus ansteigt; die Quencher-Fluoreszenz nimmt entsprechend ab. Daher wird am Ende der Amplifikation nur ein Reporter-Fluoreszenzsignal von 518 nm generiert, wenn die Zielsequenz amplifiziert wurde, während unspezifische Nebenprodukte wegen einer fehlenden Sonden-Anlagerung nicht detektiert werden.

Die quantitative Real-Time-PCR wurde mit folgendem Ansatz unter Standard-Reaktionsbedingungen durchgeführt:

Reagenzien	Endkonzentration (in 50µl)
Template-cDNA	3,0µl
3'-Primer (950µM)	4,5µl
5'-Primer (950µM)	4,5µl
Hydrolysesonde	1,0µl
H <sub>2</sub> O	12,0µl
2 x qPCR™ Puffer	25,0µl
Gesamt	50,0µl

Der Reaktionspuffer qPCR™ (2 x Reaktionspuffer, Eurogentec) enthält folgende Reagenzien:

- dNTP (1mM)
- Hot Goldstar DNA Polymerase
- MgCl<sub>2</sub> (5mM)
- Uracil-N-Glykosidase

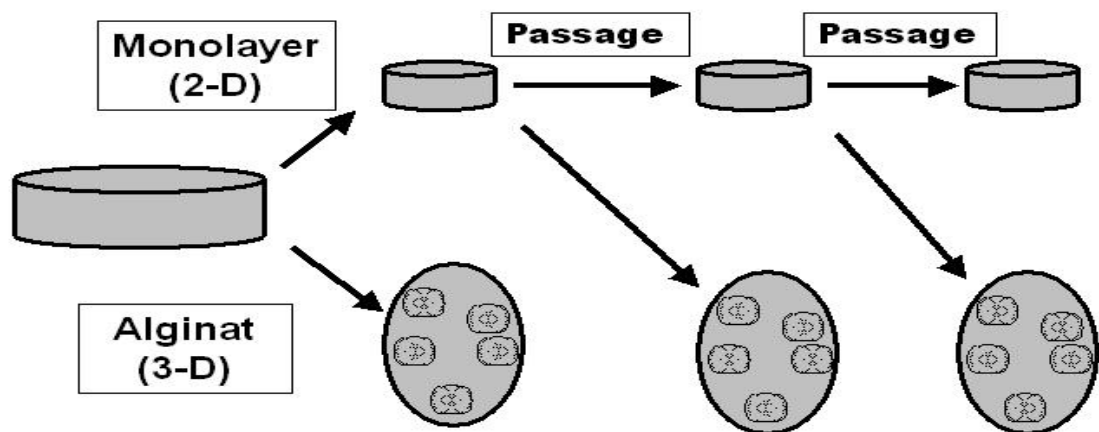
### 3.4 Versuchsaufbau

Die frisch isolierten Gelenkchondrozyten wurden zu einem Teil in der konventionellen zweidimensionalen Monolayerkultur, und zum anderen Teil in der dreidimensionalen Alginatkultur kultiviert.

Nach zwei Wochen wurde die RNA beider Zellkulturen extrahiert und die Cbfa1 RNA-Expression quantitativ bestimmt. Ein Teil der im Monolayer kultivierten Zellen wurde passagiert und dann erneut im Monolayer und zum anderen im Alginat kultiviert.

Dieses Procedere wurde bis zur vierten Passage wiederholt.

In der Abbildung 3.4.1 ist dieser Versuchsaufbau graphisch dargestellt:



**Abb. 3.4.1:** Versuchsaufbau

### 3.5 Auswertung und Statistik

Zum Vergleich der jeweiligen Cbfa1-RNA-Expression der zu untersuchenden Chondrozyten wurde die RNA-Expression der frisch isolierten Chondrozyten als 100% gewertet. Die im weiteren Verlauf in Abhängigkeit von der Zellpassage bzw. Kultivierungsmethode nachweisbare Änderung der Expression wird als prozentuale Änderung im Vergleich zu den frisch isolierten Chondrozyten angegeben.

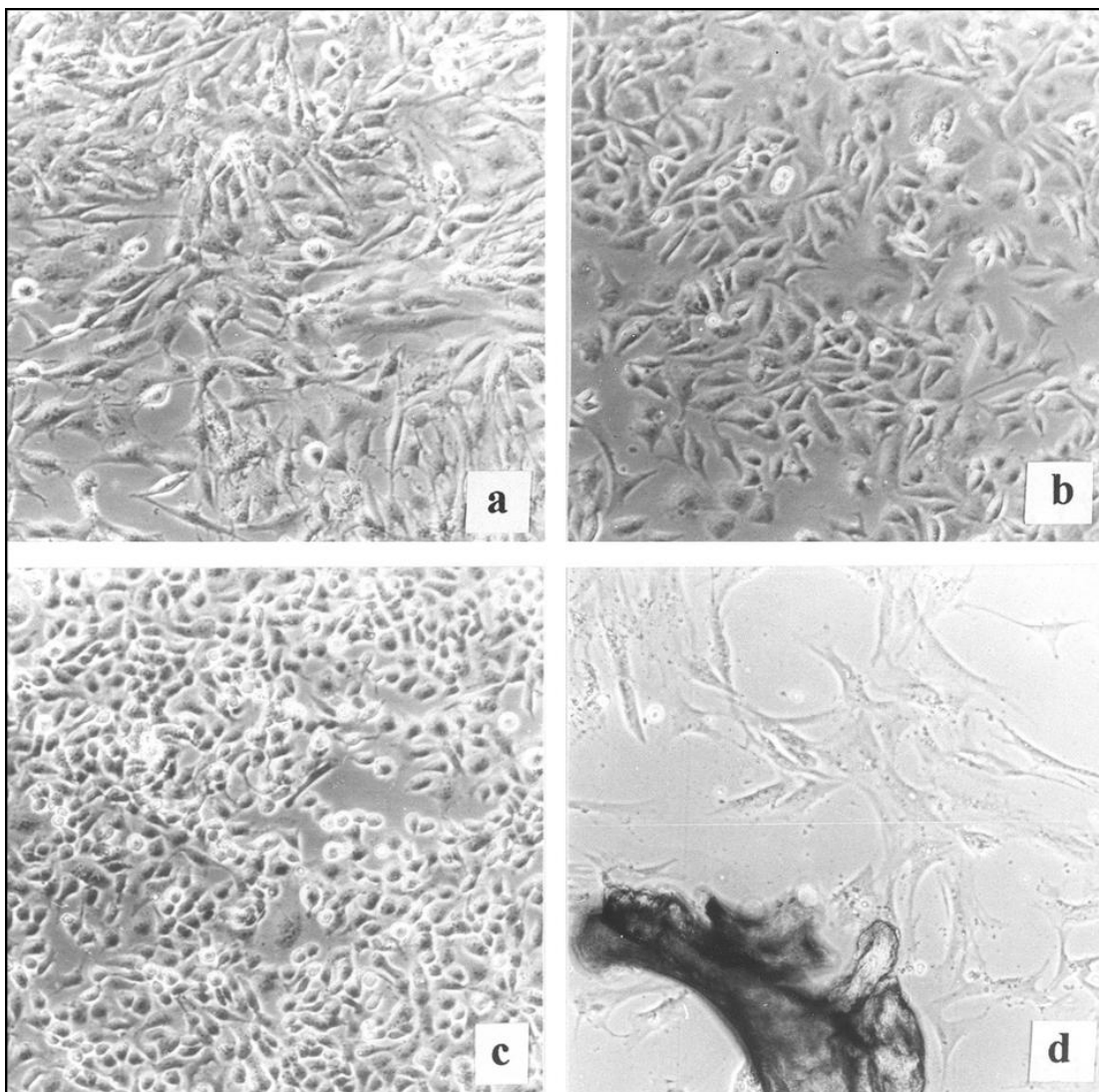
Mittels Zellzählung und gleichzeitiger Bestimmung der HPRT-RNA-Expression (House-Keeping-Gen) wurden unterschiedliche Zellzahlen als mögliche Fehlerquelle ausgeschlossen.

Zur statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse wurde der einfaktorielle Anova-Test sowie die post-hoc-Analyse von Bonverroni angewendet (Statistikprogramm SPSS). Das Signifikanzniveau betrug 0,05. Die graphische Darstellung der Balkendiagramme erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel. Die Fehlerindikatoren drücken den Standardfehler aus und sind mit einem Stern gekennzeichnet, wenn die post-hoc-Analyse von Bonverroni eine Signifikanz von  $\leq 0,05$  aufwies.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Kultivierung von humanen Chondrozyten, Osteoblasten und Osteosarkomzellen

Die morphologischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellreihen sollen anhand der folgenden Bilder exemplarisch verdeutlicht werden. Während die Osteosarkomzelllinien in vitro eher durch kleine, rundliche Zellen charakterisiert sind, zeigen humane Osteoblasten in der Monolayerkultur flache, spindelförmig bis quadratische Zelleiber (Abb. 4.1.1).



**Abb. 4.1.1:** Phasenkontrastaufnahmen der Osteosarkomzelllinien MG 63, SAOS-2, , HOS 58, sowie humaner Osteoblasten in der Monolayerkultur (200x)

a: MG 63: Zellen mit kleinem Zelleib

b: SAOS-2: Kleine, kugelförmige Zellen

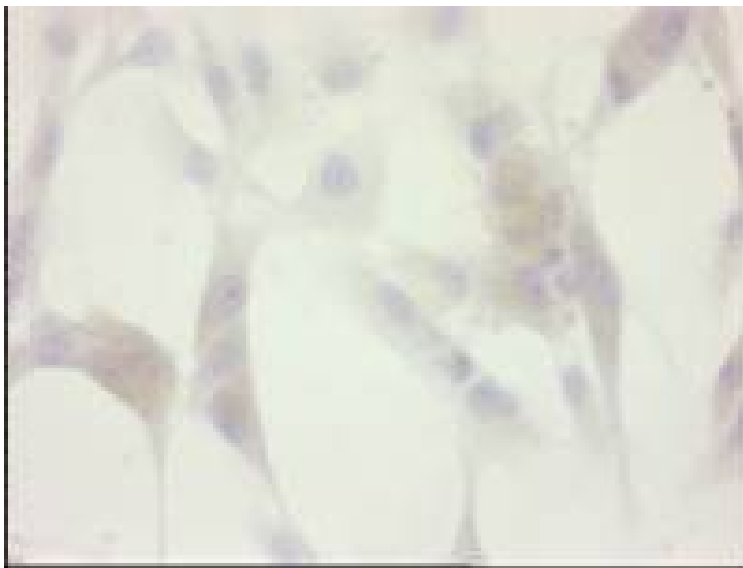
c: HOS 58: Dichtgelagerte, runde Zellen

d: Osteoblasten: flache, spindelförmige Zellen

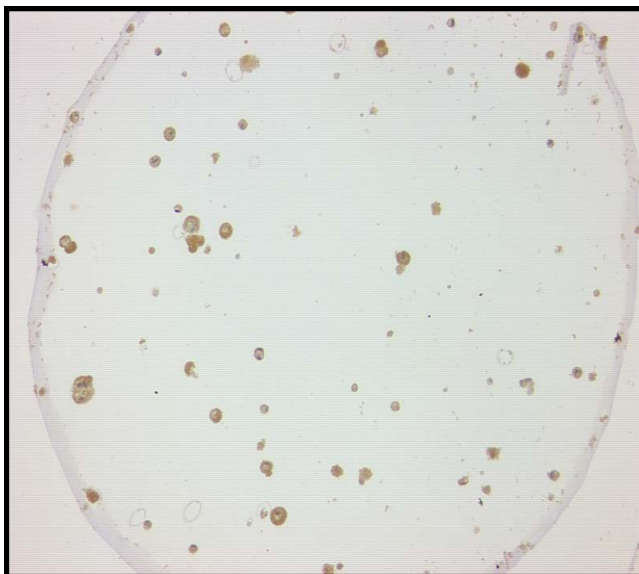


In der Monolayerkultur kultivierte Chondrozyten zeigen passageabhängig morphologische Unterschiede. Im Vergleich zu frisch isolierten Zellen weisen die Chondrozyten zu Beginn der Kultivierung ein eher rundliches Aussehen auf. In späteren Passagen verändert sich der Habitus in ein gestrecktes, fibroblastenartiges Erscheinungsbild (Abb 4.1.2).

Im Vergleich hierzu bleiben in einer (dreidimensionalen) Alginatkultur gezüchtete Chondrozyten phänotypisch stabil (Abb. 4.1.3).



**Abb. 4.1.2:** Phasenkontrastaufnahme kultivierter humaner Chondrozyten in der Monolayerkultur

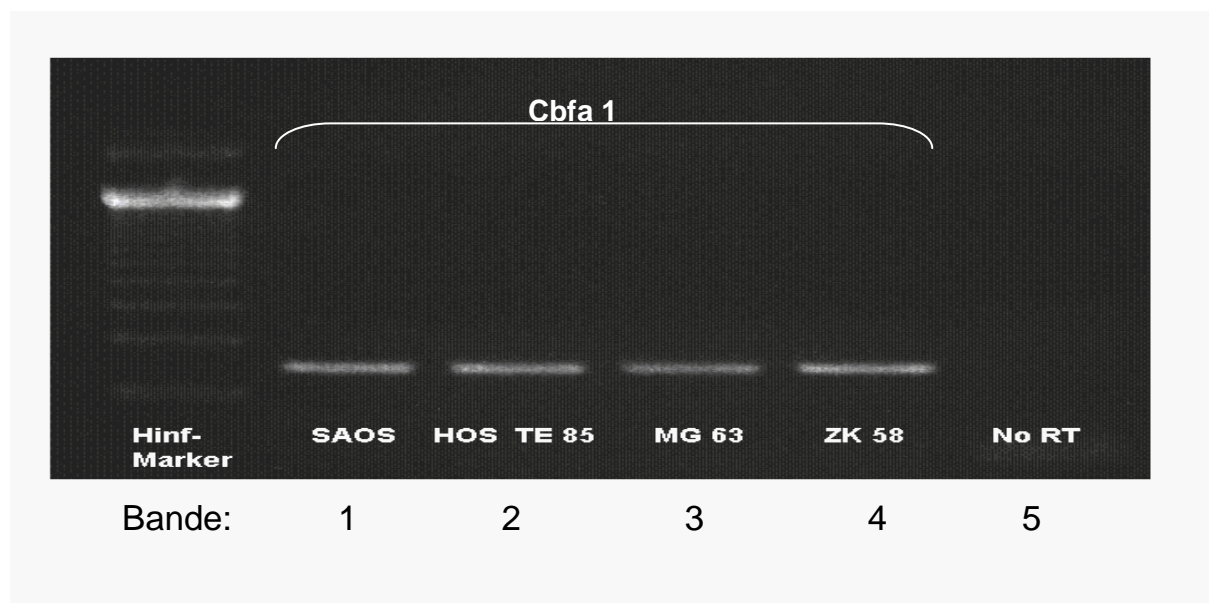


**Abb. 4.1.3:** Phasenkontrastaufnahme kultivierter humaner Chondrozyten in der Alginatkultur

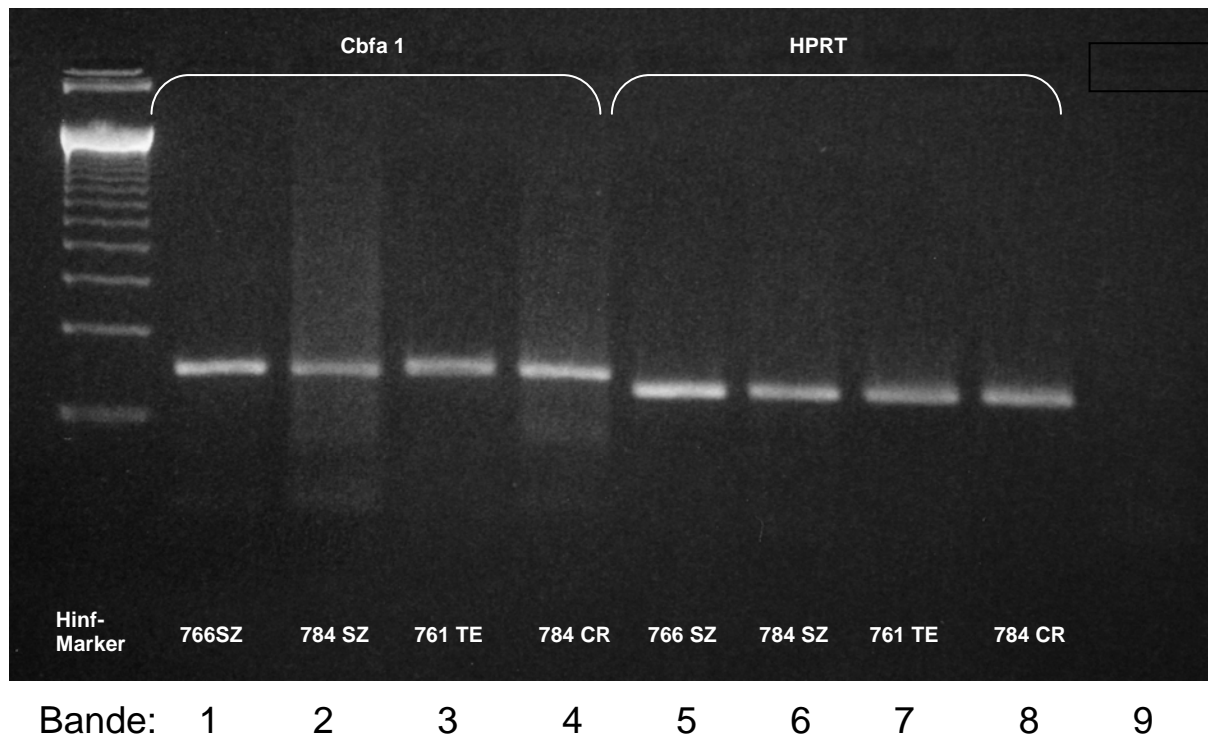
## 4.2 Qualitativer Nachweis von Cbfa1-RNA in Osteoblasten, Chondrozyten und Osteosarkomzellen

Um unterschiedliche Zellmengen der zu vergleichenden Zellpopulationen als mögliche Fehlerquelle zu vermeiden, wurden die Zellen zuvor mittels Feinpartikelzähler (Fa.Coulter Electronics Ltd. Luton UK) gezählt und nachfolgend gleiche Zellmengen verwendet. Danach wurde die RNA der zu untersuchenden Zellreihe (Osteoblasten, Osteozyten, Chondrozyten oder Osteosarkomzellen) isoliert (RNeasy-Kit, Qiagen), und evtl. noch bestehende DNA-Verunreinigungen mittels DNase-Verdau eliminiert. Die RNA wurde im Rahmen der reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Hiermit wurde dann mit Hilfe spezifischer Cbfa1-Primer eine PCR durchgeführt. Als Vergleichsmarker wurde das annähernd unregulierte HPRT verwendet, ein etabliertes „housekeeping“-Gen. Eine Cbfa1-RNA-Expression konnte sowohl in den unterschiedlichen osteozytären Zellreihen (Knochenmarksstammzellen, Osteozyten und Osteoblasten), in den Osteosarkomzelllinien (SAOS, HOS TE85, MG 63, und ZK 58), als auch in Chondrozyten unterschiedlicher Spender nachgewiesen werden.

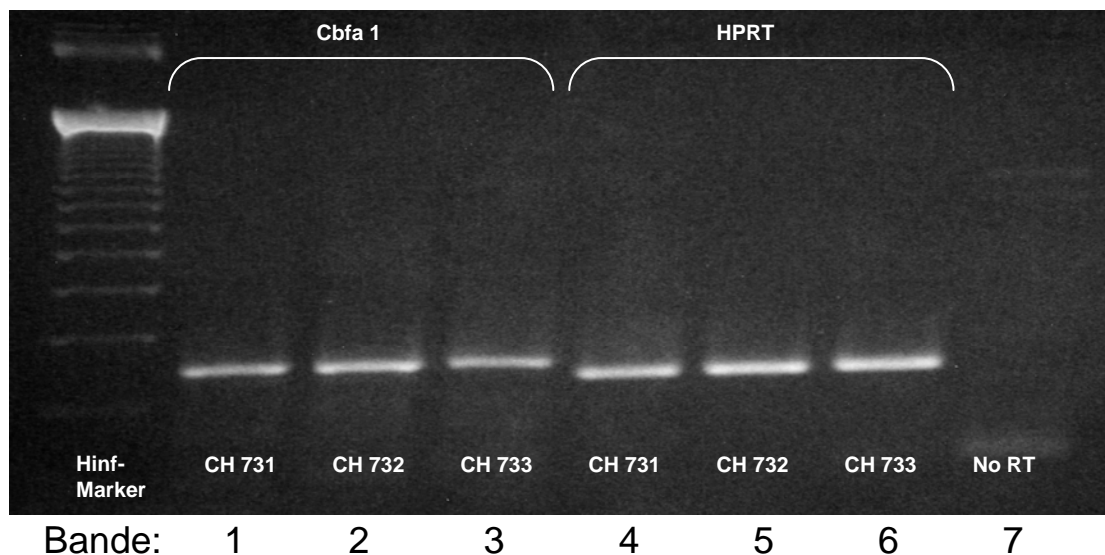
Die nachfolgenden PCR-Bilder dokumentieren exemplarisch die Cbfa1-RNA-Expression der verschiedenen Zellreihen.



**Abb. 4.2.1:** (PCR-Gel): Banden 1-4: Nachweis von Cbfa1-RNA der Osteosarkomzelllinien SAOS, HOS TE85, MG 63, und ZK 58, Bande 5: Kontrolle ohne Reverse Transkriptase, 40 Zyklen



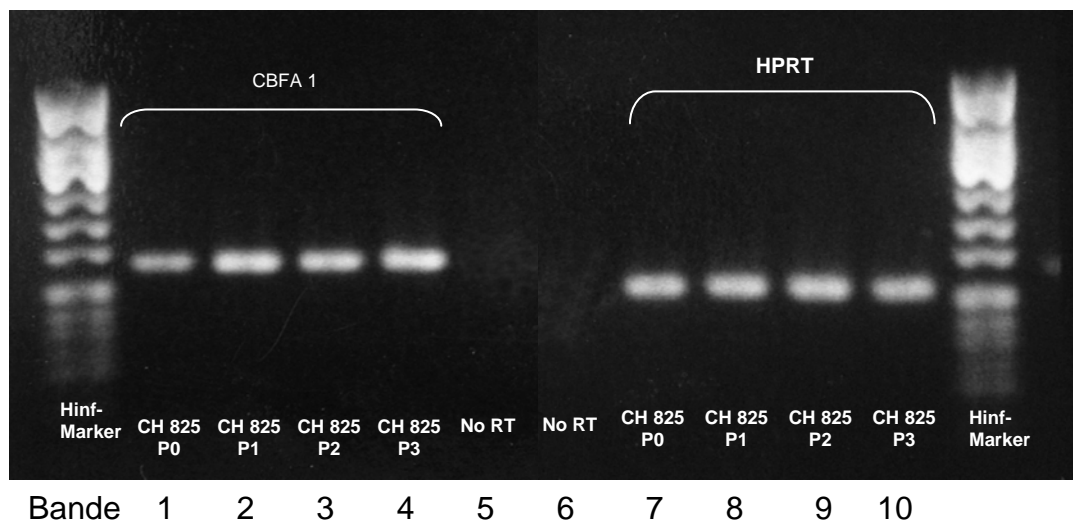
**Abb. 4.2.2:** (PCR-Gel): Banden 1-4 zeigen den Nachweis von Cbfa1-RNA in Knochenmarksstammzellen (Zellreihe 766 SZ und 784 SZ), Osteozyten (761 TE) und Osteoblasten (784 CR), Die Banden 5-8 zeigen die Expression des housekeeping-Gens HPRT dieser Zellen. Bande 9: Kontrolle ohne Reverse Transkriptase, 40 Zyklen



**Abb. 4.2.3:** (PCR-Gel): Nachweis von Cbfa1 und HPRT in unterschiedlichen Chondrozytenkulturen (Monolayerkultur, 4. Passage) Banden 1-3 Cbfa1, Bande 4-6: Hprt, Bande 7: Kontrolle ohne Reverse Transkriptase, 40 Zyklen

### 4.3 Nachweis von Cbfa1 und HPRT in der Monolayerkultur in Abhängigkeit von der Zellpassage

Als nächstes wurde die Cbfa1 Expression von Chondrozyten derselben Zellreihe in unterschiedlichen Passagierungsstadien untersucht. In der qualitativen PCR-Untersuchung zeigten sich bei einer annähernd konstanten HPRT-Expression (als zusätzlicher Hinweis für gleiche Zellzahlen) passageabhängige Unterschiede bei der Cbfa1-Expression. Sie scheint bei frisch isolierten Chondrozyten am niedrigsten zu sein und nach Passagierung in der Monolayerkultur anzusteigen.



**Abb. 4.3.1:** (PCR-Gel): HPRT- und Cbfa1-Expression einer Chondrozytenkultur in Abhängigkeit von der Zellpassage:

Bande 1: CH 825 P0: Cbfa1-RNA frisch isolierter Chondrozyten

Bande 2: CH 825 P1: Cbfa1-RNA nach der 1. Passage im Monolayer

Bande 3: CH 825 P2: Cbfa1-RNA nach der 2. Passage im Monolayer

Bande 4: CH 825 P3: Cbfa1-RNA nach der 3. Passage im Monolayer

Bande 5: Kontrolle ohne Reverse Transkriptase

Bande 6: Kontrolle ohne Reverse Transkriptase

Bande 7: CH 825 P0: HPRT-RNA frisch isolierter Chondrozyten

Bande 8: CH 825 P1: HPRT-RNA nach der 1. Passage im Monolayer

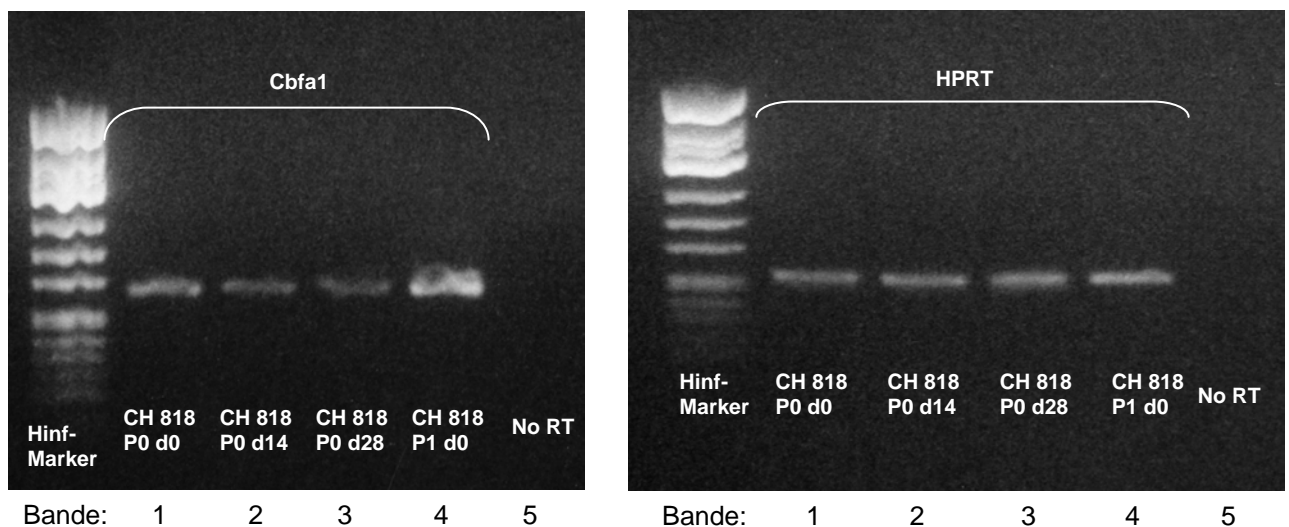
Bande 9: CH 825 P2: HPRT-RNA nach der 2. Passage im Monolayer

Bande 10: CH 825 P3: HPRT-RNA nach der 3. Passage im Monolayer, 40 Zyklen

#### 4.4 Nachweis von Cbfa1 und HPRT in Abhängigkeit von der Kultivierungsmethode

Nachdem in Chondrozytenmonolayerkulturen eine Cbfa1-RNA-Expression nachgewiesen werden konnte und hierbei Unterschiede in Abhängigkeit von der Zellpassage nachweisbar waren, wurden in einem nächsten Schritt unterschiedliche Kultivierungsmethoden miteinander verglichen. Die nachfolgende Abbildung zeigt die Cbfa1- und HPRT-RNA-Expression frisch isolierter Chondrozyten in der Monolayerkultur und in der dreidimensionalen Alginatkultur.

Während die in der Monolayerkultur kultivierten Zellen im Vergleich zu der frisch isolierten Zellpopulation einen Anstieg der Cbfa1-RNA-Expression zeigen, kommt es nach Kultivierung in der Alginatkultur sowohl nach 12- als auch nach 28 Tagen zu einer Suppression der Cbfa1-RNA-Expression.



**Abb. 4.4.1 und 4.4.2:** (PCR-Gel): Cbfa1- und HPRT-Expression einer Chondrozytenkultur in Abhängigkeit von der Kultivierungsmethode:

Bande 1 (CH 818 P0, d0): frisch isolierte Chondrozyten,

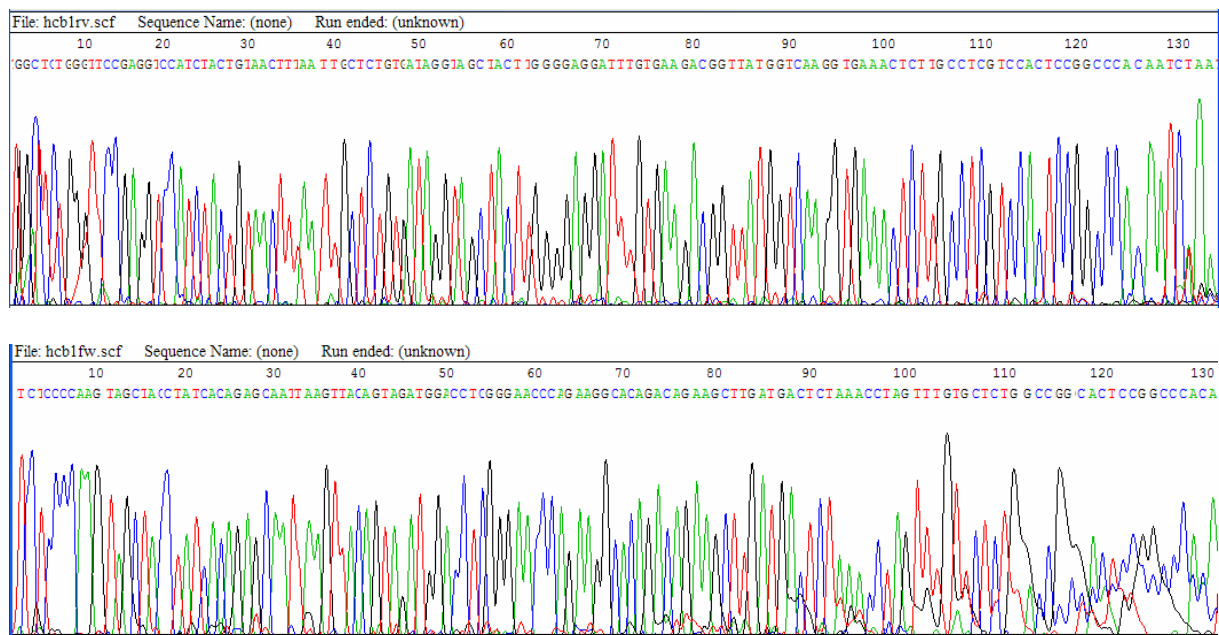
Bande 2 (CH 818 P0, d14): Nach Kultivierung über 14 Tage in der Alginatkultur , Bande 3

(CH 818 P0, d28): Nach Kultivierung über 28 Tage in der Alginatkultur, Bande 4 (CH 818

P1, d0): Nach einmaliger Passagierung in der Monolayerkultur, Bande 5: Kontrolle ohne Reverse Transkriptase, 40 Zyklen

## 4.5 Sequenzierung des PCR-Produktes

Als nächstes wurde das PCR-Produkt sequenziert. Hierbei wird durch die Verwendung eines spezifischen Primers (Oligonukleotid) von einer definierten Stelle auf einer DNA mit Hilfe der DNA-Polymerase und Desoxynukleotiden eine DNA-Synthese gestartet. Durch die Verwendung von Didesoxynukleotiden oder Oligonukleotiden, die mit fluoreszierenden Gruppen modifiziert sind, werden die Sequenzierungsprodukte Fluoreszenz markiert und durch Zugabe von Didesoxynukleotiden wird die DNA-Synthese nukleotidspezifisch abgebrochen. Nachfolgend können die Sequenzierungsprodukte durch eine kombinierte Kapillarelektrophorese und Fluoreszenzdetektion automatisch analysiert werden. Durch nachfolgenden Gendatenabgleich konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem PCR-Produkt tatsächlich um das zu untersuchende Cbfa1 handelt.



**Abb. 4.5.1:** Ausschnitt aus der graphischen Auswertung der Fluoreszenz-Sequenzierung des PCR-Produktes.

Jedem Nukleotid ist eine Farbe zugeordnet: A: Adenosin=grün, C: Cytosin=blau, G: Guanosin=schwarz, T: Thymin=rot.

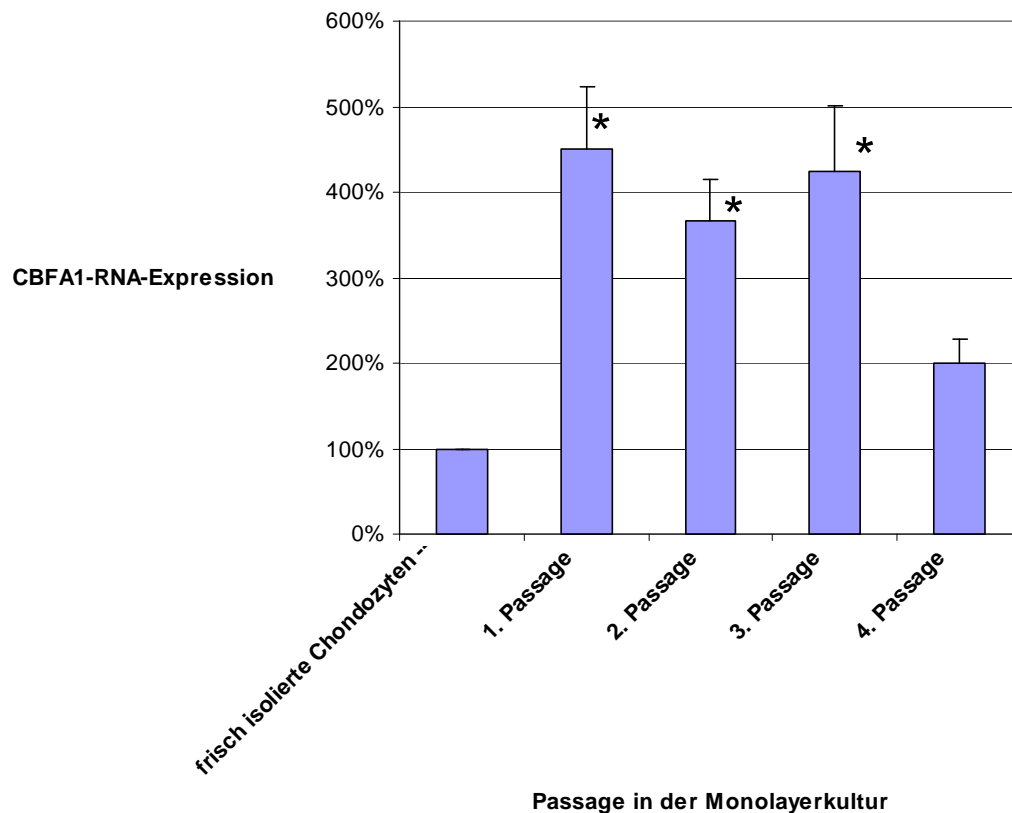
## **4.6 Quantitative Bestimmung der Cbfa1 RNA-Expression mittels realtime PCR**

Da mittels konventioneller RT-PCR nur eine eingeschränkte Aussage über quantitative Veränderungen der Cbfa1-RNA Expression gemacht werden kann, wurde im weiteren Verlauf die Cbfa1-RNA-Expression in Abhängigkeit von Zellpassage und Kulturverfahren mittels quantitativer Realtime PCR untersucht.

In der Realtime-PCR bestätigte sich ein deutlicher, statistisch signifikanter Anstieg der Cbfa1-RNA-Expression nach Kultivierung der Chondrozyten in der Monolayerkultur. Nach einmaliger Passagierung in der Monolayerkultur kam es im Durchschnitt nahezu zu einer Verfünffachung der Cbfa1-Expression. Auch nach weiterer Passagierung in der Monolayerkultur war die im Vergleich zu frisch isolierten Chondrozyten deutlich gesteigerte Cbfa1-RNA-Expression nachweisbar. Ab der vierten Passage zeigte sich ein Abfall der Cbfa1-RNA-Expression.

Diese war jedoch im Durchschnitt immer noch doppelt so hoch, verglichen mit frisch isolierten Chondrozyten (Abb.4.6.1).

## Die Cbfa1-RNA-Expression in Abhängigkeit von der Zellpassage in der Monolayerkultur



**Abb. 4.6.1:** Mittels Real-time RCR wurde bei acht verschiedenen Zelllinien die Cbfa1-RNA-Expression frisch isolierter Chondrozyten verglichen mit der, in der Monolayerkultur passagierten Chondrozyten. Graphisch dargestellt sind die prozentualen Veränderungen der Cbfa1-RNA-Expression im Vergleich zu der Cbfa1-RNA-Expression frisch isolierter humaner Chondrozyten.

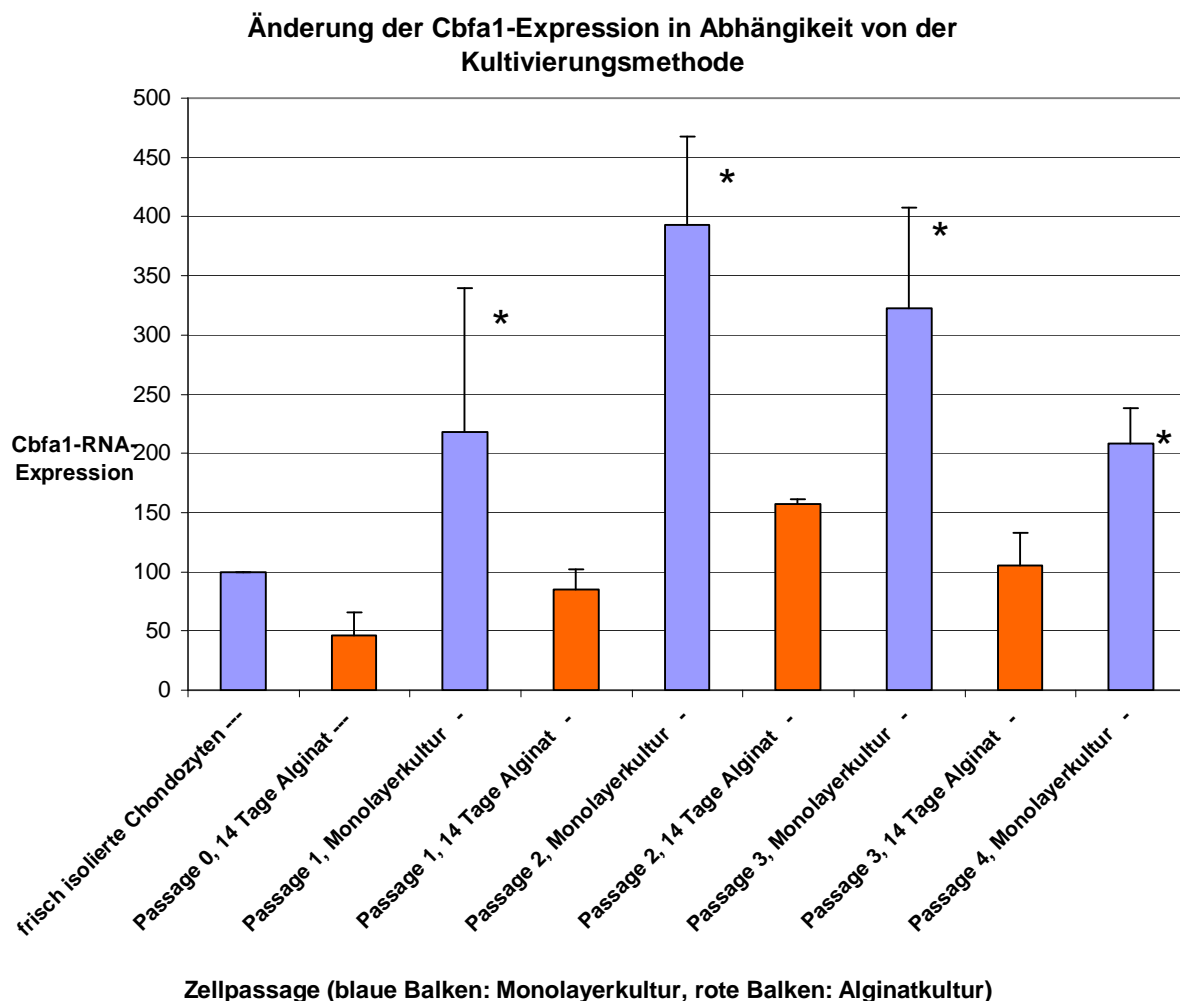
Die mit einem Stern \* gekennzeichneten Balken zeigen statistisch signifikante Veränderungen ( $P < 0,05$ )

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Monolayerkultur mit der Alginatkultur im Hinblick auf die Cbfa1-Expression mittels realtime-PCR untersucht. Hierzu wurden die frisch isolierten Zellen zu einem Teil in der Monolayerkultur, zum anderen in einer dreidimensionalen Alginatkultur kultiviert. Nach zwei Wochen wurde die RNA beider Zellkulturen extrahiert und die Cbfa1 RNA-Expression quantitativ bestimmt. Ein Teil der im Monolayer kultivierten Zellen wurde passagiert und dann erneut zum einen konventionell im Monolayer und zum anderen in der Alginatkultur kultiviert. Hierbei war in der Monolayerkultur erneut ein deutlicher, statistisch signifikanter Anstieg der Cbfa1-RNA-Expression zu verzeichnen. Es zeigte sich nach Kultivierung der frisch isolierten Chondrozyten in der dreidimensionalen Alginatkultur initial ein



Abfall der Cbfa1-RNA-Expression um durchschnittlich 50% im Vergleich zu den nativen, frisch isolierten Chondrozyten.

Der Abfall der Cbfa1-RNA-Expression nach Kultivierung in der Alginatkultur war auch bei zuvor im Monolayer kultivierten Chondrozyten nachweisbar. Nach 14-tägiger Züchtung im Alginat war die Cbfa1-Expression mit der frisch isolierter Chondrozyten zu vergleichen. Dieser Effekt zeigte sich auch noch nach dreimaliger Passagierung in der Monolayerkultur.



**Abb. 4.6.2:**

Mittels Real-time PCR bestimmte prozentuale Änderung der Cbfa1-RNA-Expression in Abhängigkeit von Zellpassage und Kulturmedium (Monolayerkultur (blaue Balken) versus Alginatkultur (rote Balken)). Graphisch dargestellt sind die prozentualen Veränderungen der Cbfa1-RNA-Expression im Vergleich zu der Cbfa1-RNA-Expression frisch isolierter humaner Chondrozyten

Die mit einem Stern \* gekennzeichneten Balken zeigen statistisch signifikante Veränderungen im Vergleich zu den frisch isolierten Chondrozyten ( $P < 0,05$ )

## 5. Diskussion

### 5.1 Veränderungen von Chondrozyten in vitro in Abhängigkeit von der Kultivierungsmethode

Kleinere Knorpeldefekte werden zum Teil bereits klinisch durch Implantation autologer, in vitro kultivierter Chondrozyten behandelt (Autologe Chondrozyten Implantation [ACI], Petterson et al., 2000). Dafür ist eine effektive in vitro Vermehrung der Chondrozyten notwendig, die derzeit nur in der Monolayerkultur gelingt und begleitet ist von einer „Dedifferenzierung“ der Chondrozyten. Der Begriff der Dedifferenzierung beschreibt die Erfahrungen, dass der Chondrozyt sich in der Monolayerkultur fundamental ändert: es kommt zu Veränderungen des Phänotyps in ein spindelförmiges, „fibroblastenartiges“ Aussehen. Zudem ändert sich die Expression bestimmter Matrixproteine (Down-Regulation der Synthese von Kollagen Typ II und der knorpelspezifischen Proteoglykane, dafür Expression von Kollagen Typ I, sowie der Kollagene III und V und X, und der alkalischen Phosphatase (Mayne et al., 1976, Benya et al., 1977 und 1978, K. von der Mark et al., 1977)). Weiterhin kann eine Wiedererlangung der Teilungsfähigkeit beobachtet werden: Adulte humane Gelenkknorpelzellen zeigen in vivo keine nennenswerte Zellteilungsrate (Aydelotte, 1992), im Monolayer kommt es dagegen zu einem deutlichen Anstieg der Proliferation (Sittinger et al., 1997, Elima und Vuorio, 1989).

Auch in unseren Versuchen konnte dies bestätigt werden: Nach Kultivierung der Chondrozyten in der Monolayerkultur kam es zu einer schnellen Proliferation der Zellen, der Phänotyp der Zellen änderte sich hin zu einem eher spindelförmigen, „fibroblastenartigen“ Aussehen. Dieser Verlust des chondrogenen Potentials scheint nach gewisser Zeit sogar irreversibel zu sein (Schulze-Tanzil et al., 2002).

Als Ursache für dieses Phänomen sind zumindest zum Teil die unphysiologischen Kulturbedingungen zu sehen: Durch ihre Einbettung in die Knorpelmatrix besteht in vivo in der Regel kein direkter Zellkontakt der Chondrozyten untereinander. Diese Situation sollte in vitro imitiert werden. Dies kann bei Chondrozyten, die enzymatisch aus der sie umgebenden Matrix isoliert wurden, nur gelingen, wenn diese auf Distanz gehalten werden. Trotz fehlendem Zellkontakt führt jedoch gerade die Kultivierung im zweidimensionalen Monolayer mit niedriger Zelldichte zu einem

Verlust des charakteristischen Phänotyps der Gelenkknorpelzellen (Deshmukh und Kline, 1976), so dass die dreidimensionale Anordnung zu bevorzugen ist.

Ein etabliertes Kulturverfahren hierfür stellt die dreidimensionale Alginatkultur dar. Isolierte Chondrozyten werden in 1,2 % Alginat suspensiert. Diese Suspension geliert in einer Calciumchlorid-Lösung zu kleinen Alginatkügelchen, die etwa 10 µl Alginat-Suspension mit jeweils 40000 Chondrozyten enthalten (Häuselmann et al., 1992). Es konnte gezeigt werden, dass unter diesen dreidimensionalen Bedingungen eine Reexpression chondrozytenspezifischer Oberflächenmarker und Matrixproteine (wie z.B. Kollagen II) zu detektieren ist und der für Chondrozyten typische rundliche Phänotyp über Monate beibehalten wird (Benja und Shaffer, 1982, Bonaventure et al., 1994, Hauselmann et al., 1994).

## **5.2 Nachweis von Cbfa1-RNA in Osteoblasten, Osteozyten, den Osteosarkomzelllinien SaOS-2, HOS 58 und MG 63, und kultivierten Chondrozyten**

Mittels PCR konnte eine Cbfa1-RNA-Expression sowohl in Osteoblasten, Osteozyten und Knochenmarkstammzellen (Präosteoblasten) nachgewiesen werden, als auch in unterschiedlichen Osteosarkomzelllinien und in Chondrozyten. Dieser Nachweis deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen: 1997 identifizierte die Arbeitsgruppe um Ducy erstmalig das Cbfa1-Gen als einen zentralen Transkriptionsfaktor der osteoblastären Zellreihe (Ducy et al., 1997). Auch die Cbfa1-Expression in Osteosarkomzellen ist für die Zelllinien SaOS-2, HOS 58 und MG 63 in der Literatur beschrieben (Sasaki-Iwaoka et al., 1999, Mori et al., 1999, Siggelkow et al., 2002). Dieser Nachweis verdeutlicht ihre Eignung als ein Zellkulturmodell der osteoblastären Zellreihe.

Überraschend war der Nachweis der Cbfa1-RNA-Expression in kultivierten Chondrozyten aus hyalinem Gelenkknorpel (4. Passage, Monolayerkultur). Bei Chondrozyten scheint die Cbfa1-Expression auf die praehypertrophe und hypertrophe Form beschränkt zu sein (Takeda et al., 2001, Rabie et al., 2004). Bei Cbfa1-Knockout-Mäusen fehlen diese Chondrozytenformen im Bereich von Femur und Humerus (Inada et al., 1999, Kim et al., 1999), so dass davon auszugehen ist, dass dieser Transkriptionsfaktor diesen Schritt entscheidend beeinflusst (Rabie et al., 2004).

Eine Cbfa1-RNA-Expression ist hingegen in gesundem, hyalinem Gelenkknorpel nicht nachweisbar (Kuboki et al., 2003).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in einem weiteren Schritt frisch isolierte Chondrozyten mit bereits mehrfach in der Monolayerkultur passagierten Zellen aus gesundem hyalinem Gelenkknorpel verglichen.

### **5.3 Anstieg der Cbfa1-RNA Expression von Chondrozyten in der Monolayerkultur**

Nachdem mittels RT-PCR eine Cbfa1-RNA-Expression von in der Monolayerkultur kultivierten humanen Chondrozyten nachgewiesen werden konnte, wurde in weiteren Versuchen der Einfluss der Kultivierungsmethode auf die Cbfa1-RNA-Expression untersucht. Hierzu wurden frisch isolierte- mit, in der Monolayerkultur kultivierten, Chondrozyten verglichen.

Es zeigte sich bereits in der konventionellen RT-PCR ein deutlicher Cbfa1-RNA Anstieg nach Passagierung der Zellen in der Monolayerkultur. Um die Veränderungen in der Cbfa1-Expression näher quantifizieren zu können, wurden die weiteren Bestimmungen mittels quantitativer Realtime-PCR durchgeführt. Hier bestätigten sich die Unterschiede in der Cbfa1-RNA-Expression: Nach Kultivierung im Monolayer zeigten die humanen Gelenkchondrozyten einen Anstieg in der Cbfa1-RNA-Expression um durchschnittlich 450% im Vergleich zu frisch isolierten Zellen derselben Zellreihe. Auch nach weiteren Zellpassagen in der Monolayerkultur blieb die Cbfa1-Expression deutlich erhöht.

Dieses Phänomen ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Vergegenwärtigt man sich jedoch die bekannten, fundamentalen Veränderungen der Chondrozyten nach Kultivierung in der Monolayerkultur im Vergleich zu den Zellen in vivo, so scheint auch eine Veränderung der Cbfa1-Expression als Folge der radikal veränderten Umgebungssituation unter Monolayer-Kulturbedingungen als wahrscheinlich. In folgenden Versuchen wurde daher die Cbfa1-Expression von Chondrozyten in der Monolayerkultur mit Chondrozyten in der dreidimensionalen Alginatkultur verglichen.

## **5.4 Veränderungen der Cbfa1-RNA Expression humaner Chondrozyten in Abhängigkeit von der Kultivierungsmethode**

Um den Einfluss der Kultivierungsmethode auf die Cbfa1-RNA-Expression zu untersuchen, wurde ein Teil der frisch isolierten Chondrozyten in der konventionellen Monolayerkultur und ein anderer Teil derselben Zellpopulation in einer dreidimensionalen Alginatkultur kultiviert. Während die Cbfa1-RNA-Expression, wie bereits vorbeschrieben, in der Monolayerkultur deutlich anstieg, zeigte sich bei den im Alginat gezüchteten Zellen im Vergleich zu den frisch isolierten Zellen tendenziell ein leichter Abfall der Cbfa1-RNA-Expression.

Zur Interpretation dieser Ergebnisse ist es wichtig, sich noch einmal die unterschiedlichen Arten von Knorpelgewebe zu vergegenwärtigen: Gelenkknorpel auf der einen Seite und transientes Knorpelgewebe im Rahmen der enchondralen Ossifikation auf der anderen. Chondrozyten in gesundem Gelenkknorpel sind phänotypisch stabil, unterliegen keinen Differenzierungsvorgängen und proliferieren nicht. Im Gegensatz hierzu ist der Chondrozyt im Rahmen der enchondralen Ossifikation durch Proliferation und Differenzierung gekennzeichnet. Die Chondrozyten beginnen mit der Synthese von Matrixproteinen (Aggrecan, Kollagen Typ II und Typ IX). Im nächsten Schritt hypertrophieren die Chondrozyten. Typischerweise findet man in diesem Stadium zur Expression von Kollagen Typ X und alkalischer Phosphatase. Im weiteren Verlauf kommt es infolge apoptotischer Prozesse zum Absterben dieser Zellen, zur Matrixkalzifizierung und zur Gefäßeinsprossung.

Cbfa1 spielt bei der Differenzierung zu hypertrophen und praehypertrophen Chondrozyten im Rahmen der enchondralen Ossifikation eine entscheidende Rolle (Takeda 2001, Rabie 2004). Eine Inaktivierung des Transkriptionsfaktors Cbfa1 führt zu einer Inhibierung der Chondrozytenreifung und einer deutlich verzögerten und eingeschränkten enchondralen Ossifikation (Ueta et al., 2001, Enomoto-Iwamoto et al., 2001). Auf der anderen Seite führt im Tierversuch eine artefizielle Überexpression von Cbfa1 zu einer überschießenden Induktion von Chondrozytenreifung und enchondraler Knochenbildung. In Bezug auf den permanenten Knorpel (wie z.B. Gelenkknorpel, die Trachealspangen, das Nasenseptum oder die Bandscheiben) zeigte diese Überexpression interessanterweise ebenfalls Veränderungen: Es waren auch hier hyperthrophierte

Chondrozyten nachweisbar, einige Regionen wurden völlig durch Knochensubstanz ersetzt (Enomoto et al., 2000, Ueta et al., 2001, Takeda et al., 2001).

Der Anstieg der Cbfa1-RNA Expression in der Monolayerkultur kann als Hinweis für eine Differenzierung der Chondrozyten in Richtung eines osteoblastären Phänotyps bzw. in eine Differenzierung in Richtung hypertrophierter Chondrozyten gedeutet werden.

Als Ursache für diese Differenzierungsvorgänge sind sicherlich die veränderten Umgebungsbedingungen zu sehen. Die physiologisch im Gelenkknorpel bestehende extrazelluläre Matrix ist in der Monolayerkultur aufgehoben, direkter Zellkontakt ist möglich. Ein weiterer wichtiger Unterschied besteht in der Ernährung und Sauerstoffversorgung der Chondrozyten: Gelenkchondrozyten sind im Vergleich zu transientem Knorpelgewebe in der Wachstumsfuge in vivo an einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck angepasst. Die Energiegewinnung erfolgt daher im Gegensatz zu fast allen anderen Zellen im Körper über eine anaerobe Energiegewinnung (Lee et al., 1997). Die Ernährung erfolgt über Diffusion. Aufgrund dieser Situation ist die Knorpeldicke limitiert. Im Gegensatz hierzu sind die Chondrozyten in der Wachstumsfuge von Blutgefäßen umgeben, die Energieversorgung erfolgt über aerobe Stoffwechselwege. Der Effekt des Sauerstoffpartialdruckes für das Differenzierungsverhalten der Gelenkchondrozyten konnte auch in vitro nachgewiesen werden (Domm et al., 2002).

## **5.5 Abfall der Cbfa1-RNA-Expression nach Überführung von zuvor im Monolayer kultivierten Chondrozyten in eine Alginatkultur**

In weiteren Versuchen untersuchten wir den Verlauf der Cbfa1-Expression von zuvor im Monolayer gezüchteten Chondrozyten nach Überführung in die dreidimensionale Alginatkultur. Verwendet wurden hierfür bis zu dreimal im Monolayer passagierte Zellen. Nach zweiwöchiger Kultivierung in der Alginatkultur kam es hierbei zu einem deutlichen Abfall der Cbfa1-RNA-Expression auf etwa das Niveau frisch isolierter Gelenkchondrozyten. Die Anzahl der Zellpassagen zeigte hierbei keine signifikanten Unterschiede. Hieraus lässt sich schließen, dass die Änderungen der Cbfa1-Expression als Folge der veränderten Umgebungssituation anzusehen sind und nach Überführung in ein (physiologischeres) dreidimensionales Kultursystem zumindest in den ersten Passagen reversibel sind. Diese Ergebnisse können als

Ausdruck einer gewissen Re-Differenzierungsfähigkeit der zuvor im Monolayer gezüchteten Chondrozyten gedeutet werden.

Mehrere Arbeiten haben bereits das Potential dieser Redifferenzierung behandelt. Die genauen Mechanismen, die zu einer Redifferenzierung dedifferenzierter Chondrozyten führen sind bisher jedoch nur wenig bekannt. Ein wichtiger Faktor scheint die Überführung in eine dreidimensionale Trägerstruktur zu sein (Benya und Shaffer, 1982, Binette et al., 1998, Bonaventure et al., 1994, Lemare et al., 1998). Wie bereits zuvor beschrieben scheinen diese Kultursysteme relativ gut die physiologisch bestehenden Umgebungsverhältnisse nachzuahmen.

Die Fähigkeit der Redifferenzierung scheint jedoch nicht unbegrenzt zu sein. In früheren Versuchen konnte gezeigt werden, dass im Monolayer kultivierte – und mehrfach passagierte Chondrozyten nach Überführung in eine dreidimensionale Kultur die Fähigkeit zur Redifferenzierung verlieren (Schulze-Tanzil et al., 2002).

Diese zumindest in den frühen Zellpassagen nachweisbare Reversibilität eröffnet neue therapeutische Optionen. Ein Problem der autologen Chondrozytentransplantation liegt in der Gewinnung einer ausreichenden Chondrozytenanzahl. Die Zellvermehrung in der Monolayerkultur birgt, wie schon mehrfach erwähnt, die Problematik der Dedifferenzierung. Wenn nun, wie unsere Versuche nahe legen, zumindest in den ersten Passagen eine Redifferenzierung der Chondrozyten möglich ist, so läge ein Lösungskonzept in einer initialen Vermehrung der Chondrozyten in einer Monolayerkultur mit nachfolgender Kultivierung in einer dreidimensionalen Kultur zur Induktion der Redifferenzierung. Die Cbfa1-Expression könnte hierfür ggf. eine Art von Markerfunktion für eine gelungene Redifferenzierung darstellen.

## **5.6 Mögliche Relevanz für das Krankheitsbild der Osteoarthritis**

Auf die Unterschiede zwischen Knorpelgewebe in der Wachstumszone im Rahmen der enchondralen Ossifikation und permanentem Gelenkknorpel wurde bereits eingegangen. Sowohl Chondrozyten in arthrotisch verändertem Gelenkknorpel als auch in vitro kultivierte Chondrozyten haben jedoch durchaus viele Parallelen mit hypertrophiertem Knorpel im Rahmen der enchondralen Ossifikation. Es kommt initial zur Proliferation, der Zelldurchmesser wird größer (die Zellen

„hypertrophieren“), Kollagen X und alkalische Phosphatase sind nachweisbar (Pacifici et al., 1991, Iwamoto et al., 1989). Auch die Expression der in der enchondralen Ossifikation wichtigen Peptide TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) und PTHrP (parathyroid hormone-related peptide) findet man in degenerativ verändertem Gelenkknorpel (Hinchliffe, 1983, de Combrugghe et al., 2000). Oft zeigen sich auch Verkalkungen in der perizellulären Matrix von arthrotischem Knorpelgewebe.

Veranschaulicht man sich nun die essentielle Bedeutung von Cbfa1 für die enchondrale Ossifikation und die Ähnlichkeiten von arthrotischem Gelenkknorpel und Knorpelgewebe in der Wachstumsfuge, so stellt sich die Frage nach einer eventuell bestehenden Bedeutung für degenerative oder entzündliche Gelenkveränderungen. Es ist vorstellbar, dass die unphysiologische „Reifung“ von Gelenkchondrozyten im Rahmen arthrotischer/arthritischer Gelenkveränderungen begleitet (oder gar abhängig) ist von einem Anstieg der Cbfa1 Expression. Hierfür finden sich in der Literatur erste Hinweise: Es konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass eine vermehrte mechanische Beanspruchung von Rattenkniefergelenken zu einem Anstieg der Expression von Cbfa1 und Kollagen Typ X führt (van Lam und Rabie, 2005). Weiterhin konnte auch in vivo im osteoarthritisch veränderten Knorpelgewebe im Vergleich zu gesundem Knorpel eine vermehrte Cbfa1-Expression nachgewiesen werden (Wang et al., 2004). Eine Erklärung hierfür könnte eine Cbfa1-induzierte Aktivierung der Matrix Metalloproteinase 13 (MMP 13) sein. MMP 13 ist ein proteolytisches Protein, welches von hypertrophierten Chondrozyten im Rahmen der enchondralen Ossifikation vermehrt sezerniert wird, aber auch bei arthrotisch /-itisch verändertem Gelenkknorpel in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden kann (Wang et al., 2004, Pei et al., 2006).

## **5.7 Plastizität bzw. Transdifferenzierung**

Transdifferenzierung und Plastizität sind Begriffe aus der Stammzellbiologie. Sie beschreiben das Phänomen, dass Stammzellen in Abhängigkeit von der Umgebung in unterschiedliche Gewebe (z.B. Herzmuskelzelle, Epithelzelle von Leber, Haut etc.) differenzieren können. Bereits 1962 konnte Gurdon anhand eines Amphibienmodells zeigen, dass Zellen von ausdifferenzierten adulten Geweben durch Transplantation ihrer Nuklei in enukleierte Eizellen in der Lage sind, neue Organismen zu generieren



(Gurdon, 1962). Die hieraus abgeleitete Theorie besagt, dass der differenzierte Status von adulten Säugerzellen im Allgemeinen nicht durch ein zelleigenes Programm bestimmt und damit irreversibel ist, sondern abhängig ist von Signalen aus der Umgebung (Hormone, Zell zu Zell-Kontakt etc.). Somit wird der Differenzierungsstatus durch einen dynamischen aktiven Prozess bestimmt, der ständiger Regulation bedarf (Blau et al., 2001, Clarke und Frisen, 2001).

Bis vor kurzem war nach Lehrmeinung die Zelldifferenzierung ein linearer Prozess, der nicht umkehrbar ist. Bereits differenzierte Zellen verlieren die Fähigkeit, sich zurück zu differenzieren. Neuere Untersuchungen stellen dieses Dogma jedoch in Frage: Es scheint, dass adulte Stammzellen unterschiedlicher Gewebe einschließlich Gehirn, Haut und Knochenmark in der Lage sind, unter fremden Umgebungsbedingungen in Zellen anderer Entwicklungsreihen zu differenzieren (Echeverri und Tanaka, 2002). Inwieweit diese Beobachtungen der Transdifferenzierung in Gewebe anderer embryonaler Entwicklungsreihen tatsächlich der Realität entsprechen, bzw. in welchem Umfang diese Vorgänge in vivo stattfinden, wird derzeit diskutiert (Anderson et al., 2001, Morshead et al., 2002).

Betrachtet man unterschiedliche körpereigene Gewebe, so findet man im Rahmen von Reparatur- und Regenerationsmechanismen eine Differenzierung von pluripotenten Stammzellen (Haut, Blutbildung, Lebergewebe etc.). Für den Gelenkknorpel gilt dies nicht. Es existiert kein Stammzellkompartiment im Gelenkknorpel. Etwaige Reparaturvorgänge müssen daher von den Chondrozyten selbst initiiert werden. Bei isolierten Knorpelveränderungen sind diese, wie bereits beschrieben, sehr beschränkt. Eine Reaktion der Chondrozyten besteht in der Formation von sogenannten „Brutinseln“. Hierbei handelt es sich um Zellansammlungen in den knochennahen Schichten des arthrotischen Knorpels. Diese sind offenbar Ausdruck des frustrierten Versuchs von Knorpel, durch Proliferation eine Selbstheilung zu initiieren. Eine Heilung des Knorpelschadens gelingt hierdurch jedoch nicht. Im Gegensatz dazu kann man in Kallusgewebe nach Knochenfrakturen typische Knorpelzellen nachweisen. Dies lässt auf differenzierungsfähige Stammzellen im Knochen schließen.

Neuere Untersuchungen haben auch für bereits ausdifferenzierte Gelenkchondrozyten in vitro ein gewisses Potential der Transdifferenzierung gezeigt. Die Arbeitsgruppe um Barbero konnte mit Hilfe von Differenzierungsmedien eine

Differenzierung von zuvor im Monolayer dedifferenzierten Gelenkchondrozyten in einen osteoblastären und zum Teil auch in einen adipogenen Phänotyp induzieren (Barbero et al., 2003).

Unter diesem Aspekt sollte der Begriff der Dedifferenzierung genauer beleuchtet werden. Der Ausdruck Dedifferenzierung impliziert, dass eine differenzierte Zelle zurückdifferenziert in ein früheres Stadium seiner Entwicklung. Ist diese Theorie schlüssig? Der Anstieg des Transkriptionsfaktors Cbfa1 in der Zellkultur kann als Ausdruck der Plastizität von Chondrozyten gedeutet werden. Wie bereits zuvor erläutert spielt Cbfa1 eine entscheidende Rolle bei der Knochenentwicklung sowohl als Transkriptionsfaktor für die osteogene Differenzierung als auch für die Differenzierung zu hypertrophierten Chondrozyten im Rahmen der enchondralen Ossifikation. Ein Anstieg von Cbfa1 in der Monolayerkultur spricht daher gegen eine Rückdifferenzierung der Zellen in ein früheres Stadium der Entwicklung. Vielmehr kann dieser Anstieg als Ausdruck einer Transdifferenzierung in einen osteoblastären Phänotyp oder einer Differenzierung in Richtung hypertropher Chondrozyten im Rahmen der enchondralen Ossifikation gedeutet werden.

Sowohl Chondrozyten als auch Osteoblasten oder Fibrozyten sind Zellen mesenchymalen Ursprungs. Ihre Verwandtschaft zeigt sich insbesondere bei der enchondralen Ossifikation und bei der Bildung eines knorpelartigen Kallusgewebes nach Knochenfrakturen. Auch wenn man isoliert Knorpelzellen betrachtet, erfüllen sie in unterschiedlichsten Geweben (Gelenkknorpel, Bandscheibe, Wachstumsfuge) völlig unterschiedliche Aufgaben. Dies verdeutlicht den essentiellen Einfluss der Umgebungsmatrix auf die Zellfunktion.

Vor diesem Hintergrund erscheint die Theorie der Transdifferenzierung unter veränderten Umgebungsbedingungen als Ausdruck der Plastizität plausibel.

Interessanterweise kommt es nach Überführung der Zellen in eine dreidimensionale Matrix wieder zu einem Abfall der Cbfa1-Expression auf Werte, die frisch isolierten Gelenkchondrozyten entsprechen. Dies spricht zusammen mit der Re-Expression knorpeltypischer Matrixproteine für eine Redifferenzierung in einen chondrogenen Phänotyp und verdeutlicht noch einmal die essentielle Bedeutung einer dreidimensionalen Umgebungsmatrix für den Erhalt eines chondrogenen Phänotyps.

## 5.8 Klinische Relevanz

In gesundem Gelenkknorpel bleiben die Chondrozyten phänotypisch stabil, es kommt zu keiner nennenswerten Zellproliferation. Die Zellmatrix als der größte Bestandteil des Gelenkknorpels scheint den stabilen Phänotyp der Chondrozyten zu unterstützen. Dieses Gleichgewicht scheint jedoch fragil zu sein: Kommt es zu Veränderungen der Knorpelmatrix, zum Beispiel im Rahmen von degenerativen, traumatischen oder entzündlichen Prozessen, so hat dies auch Einfluß auf die Knorpelzellen. Sie proliferieren, hypertrophieren, exprimieren Kollagen Typ X, Kollagen Typ I, und Osteocalcin und im weiteren Verlauf kommt es zum apoptotischen Zelltod.

Eine Expression von Kollagen Typ I ist auch bei Chondrozyten in der Monolayerkultur zu beobachten. Diese kultivierten Chondrozyten haben mit Chondrozyten in arthrotisch verändertem Knorpel die Veränderung beziehungsweise den Verlust einer extrazellulären Knorpelmatrix gemein und können daher evtl. als Modell für in vivo stattfindende pathophysiologische Veränderungen fungieren.

Zunächst verdeutlicht dies die Wichtigkeit einer intakten Umgebungsmatrix. Sie scheint verantwortlich zu sein für den Erhalt eines stabilen Phänotypes der Chondrozyten.

Klinisch sollte daher zunächst der Erhalt bzw. die Wiederherstellung einer intakten Knorpelmatrix mit phänotypisch stabilen Chondrozyten angestrebt werden. Bei isolierten Knorpeldefekten existieren hierfür bereits erste klinische Verfahren.

Eine Vorreiterrolle nimmt hier die autologe Chondrozyten Transplantation (ACT) ein. Hierbei wird zuvor an einer gesunden, wenig belasteten Stelle des Gelenkes Knorpelgewebe entnommen. Die Chondrozyten werden dann in der Monolayerkultur vermehrt und in einer zweiten Sitzung in den Knorpeldefekt reimplantiert und mit einem Periostlappen fixiert. Wie bereits ausführlich diskutiert kommt es im Rahmen der Chondrozytenvermehrung im Monolayer zu Änderungen der Zellen im Phänotyp und im Expressionsverhalten. In vivo scheint es zumindest zum Teil zu Redifferenzierungsvorgängen in Richtung eines chondrozytären Phänotyps zu kommen, auch die ersten Langzeitergebnisse scheinen vielversprechend (Peterson et al., 2000 und 2002 Brittberg et al., 2003). Nachteil dieser Behandlungsmethode ist die Notwendigkeit der Chondrozytengewinnung und der damit verbundenen

Zerstörung von gesundem Knorpelgewebe. Zudem ist auch hiermit keine Heilung ad integrum möglich.

In histologischen Nachuntersuchungen finden sich zwar häufig Merkmale von hyalinem Knorpelgewebe wie zum Beispiel der Nachweis von Kollagen Typ II (Briggs et al., 2003), die für die mechanische Stabilität wichtige arkadenförmige Anordnung der Kollagenmatrix fehlt jedoch. Neuere Behandlungsmethoden verwenden Chondrozyten in Verbindung mit resorbierbaren Hilfsmaterialien. Hier werden bereits in vitro dreidimensionale Knorpelstrukturen hergestellt. Neben den bereits erwähnten Nachteilen (zweizeitige Operation, Setzen eines erneuten Knorpeldefektes) birgt die Einbringung körperfremder Materialien evtl. zusätzliche schwer abschätzbare Risiken. Vorteile dieser Behandlungsmethode liegen in der leichteren Handhabung: Die periostlappenabhängigen Arbeitsschritte entfallen, das gezüchtete Knorpelgewebe kann teilweise sogar arthroskopisch implantiert werden, die Operationsdauer wird deutlich verkürzt (Erggelet et al., 2003). Zudem wachsen die Chondrozyten nach einer kurzen Proliferationsphase im Monolayer bereits in vitro in einer dreidimensionalen Trägermatrix, wodurch bereits in vitro eine Redifferenzierung in Richtung eines chondrozytären Phänotyps induziert wird. Die Vor- bzw. Nachteile unterschiedlicher Trägersysteme sind derzeit Gegenstand von Diskussionen, Langzeitergebnisse stehen diesbezüglich noch aus (Hendrich et al., 2003).

Die Ansätze des Tissue Engineering mit kultivierten Chondrozyten sind jedoch zum einen durch das limitierte Proliferationspotential der Zellen begrenzt, zum anderen ist der Knorpeldefekt häufig mit einer Schädigung des darunterliegenden Knochen verbunden. Diese Probleme könnten durch Verwendung mesenchymaler Stammzellen umgangen werden. Mesenchymale Stammzellen (MSC) finden sich in unterschiedlichsten Geweben wie Knochenmark, Fett- und Muskelgewebe, Haut etc.. Dadurch entfielen die bei der autologen Chondrozytentransplantation notwendige traumatische Zellgewinnung. Eine chondrogene, osteogene oder auch adipogene Differenzierung ist in vitro möglich (Pittenger et al., 1999). Im Kaninchenmodell sind chondrale und osteochondrale Defekte bereits erfolgreich durch die Implantation einer mit MSC besiedelten Kollagenmatrix behandelt worden (Wakitani et al., 1994). Erste klinische Anwendungen sind ebenfalls bereits durchgeführt worden und erscheinen erfolgsversprechend (Wakitani et al., 2002). Es bestehen jedoch noch einige ungeklärte Probleme: Trotz phänotypisch chondrogenem Aussehen werden

bei der In-vitro-Chondrogenese auf RNA-Ebene ALP (Alkalische Phosphatase) und Osteopontin exprimiert, die als osteoblastäre Marker bekannt sind. Auch von einer tierexperimentellen in-vivo ALP-Expression wird berichtet (Jäger et al., 2002). Zudem existieren die bereits bei kultivierten Chondrozyten beschriebenen Differenzierungsmechanismen in Richtung eines eher fibroblastären Phänotyps auch bei chondrogen differenzierten mesenchymalen Stammzellen (Schäfer et al., 2000). Auch Marker für hypertrophierte Chondrozyten wie Kollagen Typ X können bei differenzierten mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden (Barry et al., 2001).

Die Möglichkeit der Redifferenzierung dedifferenzierter Stammzellen ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Wie bei der Chondrozytenkultivierung scheint eine dreidimensionale Kulturmethode einen positiven Einfluß auf die phänotypische Stabilität der differenzierten Chondrozyten zu besitzen (Bosnakovski et al., 2006, Mauck et al., 2006). Zudem existieren Hinweise, dass mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark von Patienten mit fortgeschrittener Arthrose ein geringeres chondrogenes Potenzial besitzen als Progenitorzellen gesunder Spender (Murphy et al., 2002).

Zusammenfassend scheint ein grundlegendes Verständnis des Zusammenspiels unterschiedlicher Wachstumsfaktoren und Umgebungsverhältnisse im Rahmen der Chondrogenese von essentieller Bedeutung zu sein für die Entwicklung zukünftiger Therapiemöglichkeiten von Knorpeldefekten. Der Transkriptionsfaktor Cbfa1 kann hierbei eine Schlüsselrolle einnehmen. Er ist grundlegend an der Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten im Rahmen der enchondralen Ossifikation beteiligt. Dieser Differenzierungsschritt ist jedoch bei der Gelenkknorpelregeneration durch mesenchymale Stammzellen nicht erwünscht. Unsere Daten belegen bei Chondrozyten den Einfluss der Umgebungsmatrix auf die Cbfa1-Expression. Ein ähnlicher Zusammenhang bei mesenchymalen Stammzellen erscheint wahrscheinlich. Dadurch käme diesem Transkriptionsfaktor eine Rolle als (negativer) Marker für die chondrogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu.

## 5.9 Ausblick

Neben den zuvor beschriebenen und zum Teil schon klinisch eingesetzten Therapieoptionen von Knorpeldefekten erscheinen jedoch auch andere Therapiekonzepte möglich. Auf den Einfluss der extrazellulären Umgebung auf die Stabilität des chondrogenen Phänotyps wurde bereits mehrfach eingegangen. Auch der veränderte Phänotyp und die veränderten Expressionsmuster mit Produktion von Kollagen Typ X, Kollagen Typ I und alkalischer Phosphatase von Chondrozyten in arthrotischem Gelenkknorpel wurde bereits erwähnt. Es existiert zumindest in vitro ein Redifferenzierungspotential dedifferenzierter Chondrozyten (Benya und Shaffer, 1982). Dies impliziert, dass die Stabilisierung des funktionellen Chondrozytenphänotyps bzw. die Redifferenzierung osteoarthrotischer Chondrozyten entscheidend sein kann für die Wiederherstellung eines adäquaten Matrixanabolismus (Aigner und Dudhia, 1997). Um dies zu erreichen sind mehrere Therapieoptionen denkbar. Ein Konzept behandelt die Wiederherstellung physiologischer Umgebungsverhältnisse der Chondrozyten. Durch Verhinderung der Matrixdegeneration beziehungsweise durch Wiederherstellung einer intakten dreidimensionalen Knorpelmatrix könnte es möglich sein, eine Redifferenzierung der im arthrotischen Gelenkknorpel dedifferenzierten Chondrozyten zu induzieren. Dies wäre zum Beispiel durch Implantation einer resorbierbaren Knorpelmatrix in die degenerativ veränderten Knorpelareale möglich. In Kombination mit chemotaktisch aktiven Faktoren wie Zytokinen und Matrixproteinen könnte damit evtl. eine in-situ Regeneration induziert werden.

Andere Konzepte beschäftigen sich mit den Differenzierungsphänomenen von Chondrozyten im arthrotisch veränderten Gelenkknorpel. Wenn es gelänge, den Knorpelphänotyp zu stabilisieren bzw. eine Redifferenzierung in-situ zu induzieren, so könnte hiermit evtl. auch ein adäquater Matrixanabolismus wiederhergestellt werden.

Aktuell werden große Hoffnungen in die Stammzellforschung gesetzt. Mesenchymale Stammzellen können bereits heute in vitro in „chondrozytenartige“ Zellen differenziert werden. Viele Probleme der autologen Chondrozytentransplantation (zweizeitige Operation, das Setzen von zusätzlichen Knorpelschäden, geringe Zellausbeute) könnten hierdurch gelöst werden. Bis zum Einzug in die klinische Praxis müssen jedoch noch viele derzeit noch ungeklärte

Fragen beantwortet werden (Charakterisierung der differenzierten Zellen, Langzeitstabilität der differenzierten Stammzellen in vivo etc.) .

Die Rolle des Transkriptionsfaktors Cbfa1 bei diesen Therapieansätzen ist bisher noch unklar. Die Ähnlichkeiten zwischen Chondrozyten im arthrotisch veränderten Gelenkknorpel und Chondrozyten in der Wachstumsfuge legen Nahe, dass Cbfa1 auch bei der Knorpeldegeneration eine pathophysiologische Bedeutung zukommt. Über eine mögliche Relevanz dieses Transkriptionsfaktors für das Krankheitsbild der Osteoarthritis müssen jedoch erst weitere Untersuchungen Aufschluss geben.

## 6. Zusammenfassung

Chondrozyten sind in entscheidendem Maße abhängig von der sie umgebenden extrazellulären Matrix. In gesundem Gelenkknorpel bleiben sie phänotypisch stabil und zeigen keine wesentlichen Differenzierungsvorgänge. Entzündliche, traumatische oder generativ bedingte Veränderungen der extrazellulären Matrix führen hingegen zu Änderungen sowohl im Phänotyp als auch im Expressionsverhalten knorpeltypischer Matrixproteine der Chondrozyten. Auch in vitro ist diese Abhängigkeit der Chondrozyten von der Umgebungsmatrix zu beobachten. Während sie unter dreidimensionalen Kulturbedingungen an nähernd phänotypisch und im Expressionsverhalten gesunden Chondrozyten in vivo entsprechen, kommt es in der zweidimensionalen Monolayerkultur zu einem fibroblastenartigen Aussehen mit einem veränderten Kollagen-Expressionsmuster.

Cbfa1 ist ein essentieller Transkriptionsfaktor der osteo-kartilaginären Zellreihe. Das Fehlen, bzw. Mutationen dieses Transkriptionsfaktors gehen einher mit erheblichen Störungen in der Skelettentwicklung. Auch im Rahmen der Knorpelentwicklung, insbesondere bei der Ausbildung hypertropher Chondrozyten der enchondralen Ossifikation besitzt dieses Gen eine zentrale Rolle.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsverhalten von Cbfa1 in unterschiedlichen Zellen der osteo-kartilaginären Zellreihe untersucht. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf den Einfluss der Kultivierungsmethode auf die Cbfa1-Expression von humanen Gelenkchondrozyten gerichtet.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass sowohl in Osteoblastenzelllinien, als auch in unterschiedlichen Osteosarkomzelllinien und in Chondrozyten (Monolayerkultur) Cbfa1-RNA nachweisbar ist.

Vor dem Hintergrund der Dedifferenzierungsphänomene kultivierter Chondrozyten wurde nachfolgend die Cbfa1-mRNA-Expression frisch isolierter Chondrozyten verglichen mit bereits in der Monolayerkultur passagierten Zellen mittels quantitativer PCR. Hier zeigte sich nach Passagierung in der Monolayerkultur ein deutlicher Anstieg der Cbfa1-RNA-Expression. Dieses hohe Expressionsniveau war auch nach mehrfachen Passagierungen im Monolayer nachweisbar.

Im nächsten Schritt wurde die Cbfa1-RNA-Expression unter verschiedenen Kulturbedingungen untersucht: Die frisch isolierten Chondrozyten wurden zum einen in der Monolayer – und zum anderen in der Alginatkultur kultiviert. Nach 14 Tagen wurde erneut die Cbfa1-RNA-Expression untersucht. Die im Alginat kultivierten



Chondrozyten zeigten eine deutlich niedrigere Cbfa1-RNA-Expression als diejenigen Zellen in der Monolayerkultur. Insgesamt war die Cbfa1-RNA-Expression von Chondrozyten in der Alginatkultur mit der frisch isolierter Chondrozyten vergleichbar. In der folgenden Untersuchungsreihe wurde ein Teil der im Monolayer gezüchteten, Chondrozyten überführt in die dreidimensionale Alginatkultur. Verglichen mit den Chondrozyten in der Monolayerkultur kam es hierbei zu einem deutlichen Abfall der Cbfa1-RNA-Konzentration bis nahezu auf das Niveau frisch isolierter Chondrozyten.

Zusammenfassend lassen sich aufgrund der vorliegenden Ergebnisse folgende Schlüsse ziehen:

1. Cbfa1-RNA ist sowohl in kultivierten Osteoblasten- und Osteosarkomzellreihen als auch in Chondrozyten nachweisbar.
2. Die Kultivierungsmethode hat bei Chondrozyten Einfluß auf die Cbfa1-RNA Expression.
3. Der Anstieg der Cbfa1-RNA Expression in der Monolayerkultur ist nach Überführung in ein dreidimensionales Alginatsystem zumindest in den ersten Passagen reversibel.
4. Der Abfall der Cbfa1-RNA Expression geht einher mit Redifferenzierungsvorgängen der Zellen in Richtung eines chondrogenen Phänotyps.

Die vorliegenden Ergebnisse legen eine Bedeutung des Transkriptionsfaktors Cbfa1 für in vitro bestehende Dedifferenzierungsphänomene kultivierter Chondrozyten nahe. Hierbei scheint die Umgebungsmatrix der Zellen einen direkten Einfluss auf die Cbfa1 Expression zu besitzen. Der Anstieg der Cbfa1-RNA-Expression in der Monolayerkultur kann als Ausdruck einer bestehenden Fähigkeit der Transdifferenzierung der Chondrozyten in Richtung eines osteoblastären Phänotyps gedeutet werden oder aber als eine weitere Ausdifferenzierung in Richtung hypertropher Chondrozyten, wie sie auch im Rahmen der enchondralen Ossifikation zu finden sind. Der Abfall der Cbfa1-RNA-Expression nach Überführung von zuvor in

der Monolayerkultur gezüchteten Zellen in die Alginatkultur spricht für eine, zumindest in den ersten Zellpassagen noch gegebene, Fähigkeit der Zellen zur Redifferenzierung.

Neuere Untersuchungen legen eine Bedeutung des Transkriptionsfaktors Cbfa1 für pathophysiologische Prozesse im Rahmen von degenerativen oder entzündlichen Gelenkveränderungen in vivo nahe (Wang et al., 2004, Pei et al., 2006). Dies muss jedoch in weiteren Versuchen verifiziert werden.

## 7. Summary

Chondrocytes are critically dependent on their surrounding extracellular matrix. In healthy joint cartilage they remain phenotypically stable without any significant differentiation. In contrast, inflammatory, traumatic or degenerative changes of the extracellular matrix lead to changes of the chondrocytic phenotype including the expression of specific matrix proteins and proliferation. Likewise, change of matrix conditions in-vitro particular in the two-dimensional monolayer-culture is associated with phenotype switching of chondrocytes.

Core binding factor  $\alpha$  1 (Cbfa1) is an essential transcription factor of chondrocytic and osteocytic lineage. The absence or mutation of this gene is associated with anomalies of bone and cartilage development.

In this study we confirmed the in-vitro Cbfa1-RNA-expression on osteocytes, osteoblasts, chondrocytes and osteosarcoma cells. In addition, influence of two- and three-dimensional matrix culture on Cbfa1 expression of chondrocytes was investigated.

Cbfa1-mRNA expression of freshly isolated chondrocytes was much lower compared with cells cultivated in a monolayer culture. Moreover, Cbfa1 expression on chondrocytes maintained in three-dimensional alginate matrix was lower than in two-dimensional culture, comparable to freshly isolated chondrocytes.

Sequential culture with transfer from monolayer to three-dimensional alginate culture led to reduction of Cbfa1-RNA-expression to a similar level of freshly isolated chondrocytes.

These results suggest a relevance of Cbfa1 for chondrocyte plasticity in-vitro and in-vivo, i. e. capacity for de-, re-, and transdifferentiation. The extracellular matrix has a profound influence on Cbfa1 expression. The increase of Cbfa1-RNA expression in the monolayer culture could represent a transdifferentiation towards an osteocytic phenotype; alternatively it could be a precondition of subsequent chondrocyte hypertrophy, as seen in enchondral ossification. The decrease of Cbfa1 expression after change of culture conditions from monolayer to the more physiologic three-dimensional matrix during the first cell culture passages does provide additional evidence for chondrocyte plasticity.

Recent studies propose a role of Cbfa1 in degenerative and inflammatory joint diseases in-vivo. These findings have to be confirmed in further investigations.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Aigner T, Stoss H, Weseloh G, Zeiler G, von der Mark K. (1992)  
Activation of collagen type II expression in osteoarthritic and rheumatoid cartilage.  
Virchows archiv B Cell Pathol Incl Mol Pathol. 62(6):337-45.
2. Aigner T, Dudhia J. (1997)  
Phenotypic modulation of chondrocytes as a therapeutical target in osteoarthritis : a hypothesis.  
Ann Rheum Dis 56(5):287-91.
3. Aigner T, Kim HA (2002)  
Apoptosis and cellular vitality : issues in osteoarthritic cartilage degeneration.  
Arthritis Rheum 46(8):1986-96. Review.
4. Anderson: DJ, Gage FH, Weissman IL (2002)  
Can stem cells cross lineage boundaries?  
Nature Medicine 7(4):393-5.
5. Aulthouse AL, Beck M, Griffey E, Sanford J, Arden K, Machado MA, Horton WA. (1989)  
Expression of the human chondrocyte phenotype in vitro.  
In Vitro Cell Dev Biol 25(7):659-68.
6. Aydelotte MB, Kuettner KE (1988)  
Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes  
Connect Tissue Res 18:205-222 und 223-234

7. Aydelotte MB (1992)  
Articular cartilage and osteoarthritis. Inheterogeneity of articular chondrocytes.  
New York Raven Press
8. Ballock RT, Heydemann A, Wakefield LM, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB. (1993)  
TGF- $\beta$ 1 prevents hypertrophy of epiphyseal chondrocytes: regulation of gene expression for cartilage matrix proteins and metalloproteases.  
Dev. Biol. (2):414-29.
9. Barbero A, Ploegert S, Heberer M, Martin I. (2003)  
Plasticity of clonal populations of dedifferentiated adult human articular chondrocytes.  
Arthritis and Rheumatism (5):1315-25.
10. Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. (2001)  
Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components.  
Exp Cell Res. 268(2):189-200.
11. Battmann A, Jundt G, Schulz A. (1997)  
Endosteal human bone cells (EBC) show age-related activity in vitro.  
Exp Clin Endocrinol Diabetes 105(2):98-102.
12. Benya PD, Shaffer JD. (1982)  
Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels.  
Cell 30(1):215-24.
13. Benya PD, Padilla SR, Nimni ME. (1977)  
The progeny of rabbit articular chondrocytes synthesize collagen types I and II and type I trimer, but not type II.  
Biochemistry 8;16(5):865-72.

14. Benya PD, Padilla SR, Nimni ME. (1978)  
Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of dedifferentiated function in culture.  
Cell 15(4):1313-21.
15. Binette F, McQuaid DP, Haudenschild DR, Yaeger PC, McPherson JM, Tubo R. (1998)  
Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro.  
J Orthop Res 16(2):207-16.
16. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. (2001)  
The evolving concept of a stem cell: entity or function?  
Cell 105(7):829-41.
17. Bonaventure J, Kadhon N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselin C, Freisinger P. (1994)  
Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes in alginate beads.  
Exp. Cell. Resc. 212(1):97-104.
18. Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Takagi S, Okumura M, Fujinaga T. (2006)  
Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis.  
Biotechnol Bioeng. 93(6):1152-63.
19. Briggs TW, Mahroof S, David LA, Flannelly J, Pringle J, Bayliss M. (2003)  
Histological evaluation of chondral defects after autologous chondrocyte implantation of the knee.  
J Bone Joint Surg Br. 85(7):1077-83.

20. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. (1994)  
Treatment of deep cartilage defects with autologous chondrocyte transplantation.  
N Engl J Med. 331(14):889-95.
21. Brittberg M, Peterson L, Sjogren-Jansson E, Tallheden T, Lindahl A. (2003)  
Articular Cartilage Engineering with Autologous Chondrocyte Transplantation. A review of recent developments.  
J Bone Joint Surg Am. 85-A Suppl 3:109-15.
22. Bruckner P, van der Rest M. (1994)  
Structure and Function of cartilage collagens.  
Microsc. Res. Technol. 28(5):378-84.
23. Clarke D, Frisen J. (2001)  
Differentiation potential of adult stem cells.  
Curr Opin Genet Dev. 11(5):575-80.
24. de Crombrughe B, Lefebvre V, Behringer RR, Bi W, Murakami S, Huang W. (2000)  
Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation.  
Matrix Biol. 19(5):389-94.
25. de Crombrughe B, Lefebvre V, Nakashima K. (2001)  
Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation  
Curr Opin Cell Biol. 13(6):721-7.
26. Czitrom AA, Langer F, McKee N, Gross AE. (1986)  
Bone and cartilage allotransplantation. A review of 14 years of research and clinical studies.  
Clin. Orthop (208):141-5.

27. Dedrick DK, Goldstein SA, Brand KD, O`Condor BL, Goulet RW, Albrecht M (1993)  
A longitudinal study of subchondral plate and trabecular bone in cruciate-deficient dogs with osteoarthritis followed up for 54 month  
Arthritis Rheum. 36: 1460-7
28. Dell'Accio F, De Bari C, Luyten FP. (2001)  
Molecular markers prective of the capacity of expanded human articular chondrocytes to form stabile cartilage in vivo.  
Arthritis rheum. 44(7):1608-19.
29. Deshmukh K, Kline WH. (1976)  
Characterization of collagen and its precursors synthesized by rabbit-articular-cartilage cells in various culture systems.  
Eur J Biochem 69(1):117-23.
30. Ding M, Dalstra M, Linde F, Hvid I (1998)  
Changes in the stiffness of the human tibial cartilage-bone complex in early-stage osteoarthritis.  
Acta Orthop Scand 69:358-63
31. Domm C, Schunke M, Christesen K, Kurz B. (2002)  
Redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate culture under low oxygen tension.  
Osteoarthritis Cartilage. 10(1):13-22.
32. Drissi MH, Li X, Sheu TJ, Zuscik MJ, Schwarz EM, Puzas JE, Rosier RN, O'Keefe RJ. (2003)  
Runx2/Cbfa1 stimulation by retinoic acid is potentiated by BMP2 signaling through interaction with Smad1 on the collagen X promoter in chondrocytes.  
J Cell Biochem. 90(6):1287-98.



33. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. (1997)  
OSF2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation.  
Cell 89(5):747-54.
34. Echeverri K, Tanaka EM. (2002)  
Ectoderm to Mesoderm Lineage Switching During Axolotl Tail  
Regeneration.  
Science 298(5600):1993-6.
35. Elima K, Vuorio E. (1989)  
Expression of mRNAs for collagens and other matrix components in  
dedifferentiating and redifferentiating human chondrocytes in culture.  
FEBS Lett 258(2):195-8.
36. Enomoto H, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Nomura S, Himeno M,  
Kitamura Y, Kishimoto T, Komori T. (2000)  
Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation.  
J Biol Chem 275(12):8695-702.
37. Enomoto-Iwamoto M, Enomoto H, Komori T, Iwamoto M. (2001)  
Participation of Cbfa1 in regulation of chondrocyte maturation.  
Osteoarthritis and Cartilage 9 Suppl A:S76-84.
38. Erggelet C, Sittinger M, Lahm A. (2003)  
The arthroscopic implantation of autologous chondrocytes for the treatment  
of full thickness cartilage defects of the knee joint.  
Arthroscopy 19(1):108-10.
39. Felson DT, Neogi T (2004)  
Osteoarthritis: Is it a disease of cartilage or of bone?  
Arthritis and Rheumatism 50: 341-344

40. Fischer A. (1922)  
A pure strain of cartilage cells in vitro.  
J Exp Med 35: 379-384
41. Fosang AJ, Neame PJ, Hardingham TE, Murphy G, Hamilton JA. (1991)  
Cleavage of cartilage proteoglycan between G1 and G2 domains by  
stromelysins.  
J. Biol. Chem. 266(24):15579-82.
42. Gilbert SF (2000)  
Developmental Biology  
Sunderland, Sinauer Associates Inc.
43. Green WT. (1971)  
Behavior of articular chondrocytes in cell culture.  
Clin Orthop 75: 248-260
44. Gundle R, Beresford JN. (1995)  
The isolation and culture of cells from explants of human trabecular  
bone.  
Calcif Tissue Int 56 (Suppl 1): S8-10., 1995.
45. Gurdon JB. (1962)  
The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells  
of feeding tadpoles.  
J Embryol. Exp. Morphol. 10:622-40.
46. Hamerman D (1989)  
The biology of osteoarthritis.  
N. Engl. J. Med 320(20):1322-30.

47. Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, Ogawa S, Katsumata T, Yamaguchi A, Komori T, Nakatsuka M. (2000)  
Cbfa1 Isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation.  
J.Biol.Chem 274(11):6972-8.
48. Hardingham TE, Fosang AJ, Dudhia J. (1994)  
The structure, function and turnover of aggrecan, the large aggregating proteoglycan from cartilage.  
Eur J Clin Chem Clin Biochem. 32(4):249-57.
49. Hauselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, Kuettner KE, Thonar EJ. (1994)  
Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads.  
J. Cell Sci. 107:17-27.
50. Hauselmann HJ, Aydelotte MB, Schumacher BL, Kuettner KE, Gitelis SH, Thonar EJ. (1992)  
Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads.  
Matrix 12(2):116-29.
51. Hendrich, Nöth, Eulert (2003)  
Cartilage surgery and future perspectives.  
Springer-Verlag
52. Hinchliffe (1983)  
Growth of cartilage.  
Cartilage, Vol 2 New York Academic Press
53. Hinrichs B, Dreyer T, Battmann A, Schulz A. (1993)  
Histomorphometry of active osteoblast surface labelled by antibodies against non-collagenous bone matrix proteins.  
Bone 14 (3): 469-72., 1993.

54. Inada M, Yasui T, Nomura S, Miyake S, Deguchi K, Himeno M, Sato M, Yamagiwa H, Kimura T, Yasui N, Ochi T, Endo N, Kitamura Y, Kishimoto T, Komori T. (1999)  
Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice.  
Dev Dyn 214(4):279-90
55. Inoue K, Ozaki S, Shiga T, Ito K, Masuda T, Okado N, Iseda T, Kawaguchi S., Ogawa M, Bae SC, Yamashita N, Itohara S, Kudo N, Ito Y (2002)  
Runx3 controls the axonal projection of proprioceptive dorsal root ganglion neurons.  
Nat. Neurosci. 5, 946-954.
56. Iwamoto M, Sato K, Nakashima K, Shimazu A, Kato Y. (1989)  
Hypertrophy and calcification of rabbit permanent chondrocytes in pelleted cultures: synthesis of alkaline phosphatase and 1,25 dihydroxycholecalciferol receptor.  
Dev Biol. 136(2):500-7.
57. Jager M, Wild A, Fuss M, Werner A, Krauspe R. (2002)  
Vorteile von Biomatrices bei der Chondrogenese von pluripotenten mesenchymalen Stammzellen  
Z Orthop Ihre Grenzgeb. 140(6):681-9.
58. Johansen JS, Williamson MK, Rice JS, Price PA. (1992)  
Identification of proteins secreted by human osteoblastic cells in culture.  
J Bone Miner Res 7 (5): 501-12.,1992.
59. Karpouzas GA, Terkeltaub RA. (1999)  
New developments in the pathogenesis of articular cartilage calcification.  
Curr Rheumatol Rep. 1(2):121-7.

60. Kawiak J, Moskalewski S, Darzynkiewicz Z. (1965)  
Isolation of chondrocytes from calf cartilage.  
Exp Cell Res 39: 59-68
61. Kern A, Jundt G, Vonderheid B, Groscurth P, Schulz A (1990)  
Establishment and functional characterisation of a human osteosarcoma cell line (HOS 58).  
J Bone Miner. Res. 8: 651-7
62. Kim IS, Otto F, Zabel B, Mundlos S. (1999)  
Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1.  
Mech Dev 80(2):159-70.
63. Knuchel R, Hofstadter F. (1994)  
In vitro culture: from tissue to cell line  
Pathologe 15 (3): 141-9., 1994.
64. Kuboki T, Kanyama M, Nakanishi T, Akiyama K, Nawachi K, Yatani H, Yamashita K, Takano-Yamamoto T, Takigawa M (2003)  
Cbfa1/Runx2 gene expression in articular chondrocytes of the mice temporomandibular and knee joints in vivo.  
Arch Oral Biol. 48(7):519-25.
65. Kühnel W. (1995)  
Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie  
Thieme-Verlag, 9. Auflage: 138-140
66. Layton MW, Goldstein SA, Goulet RW, Feldkamp LA, Kubinski DJ, Bole GG (1988)  
Examination of subchondral bone architecture in experimental osteoarthritis by microscopic computed axial tomography.  
Arthritis Rheum. 31:1400-5

67. Lee DA, Salih V, Stockton EF, Stanton JS, Bentley G. (1997)  
Effect of normal synovial fluid on the metabolism of articular chondrocytes  
In vitro.  
Clin. Orthopädis. (342):228-38.
68. Lemare F, Steimberg N, Le Griel C, Demignot S, Adolphe M. (1998)  
Dedifferentiated chondrocytes cultured in alginate beads: restoration of the  
dedifferentiated phenotype and of the metabolic responses to  
interleukin-1 $\beta$ .  
J Cell Physiol. 176(2):303-13.
69. Leonhard H. (1990)  
Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen.  
Thieme-Verlag
70. Levanon D., Brenner O., Negreanu V, Bettoun D, Woolf E, Eilam R.,  
Lotem J, Gat U, Otto F, Speck N, und Groner Y. (2001)  
Spatial and temporal expression pattern of Runx3 (Aml2) and Runx1  
(Aml1) indicates non-redundant functions during mouse embryogenesis.  
Mech. Dev. 109, 413-417.
71. Li QL., Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, Lee KY,  
Nomura S, Lee CW, Han SB, Kim HM, Kim WJ, Yamamoto H, Yamashita  
N, Yano T, Ikeda T, Itohara S, Inazawa J, Abe T, Hagiwara A, Yamagishi  
H, Ooe A, Kaneda A, Sugimura T, Ushijima T, Bae SC, Ito Y (2002)  
Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric  
cancer.  
Cell 109, 113-124.
72. Ma HL, Hung SC, Lin SY, Chen YL, Lo WH. (2003)  
Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in  
alginate beads.  
J Biomed Mater Res. 64A(2):273-81.

73. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. (1998)  
Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow.  
Tissue Eng. 4(4):415-28.
74. Mankin HJ. (1982)  
Current concepts review. The response of articular cartilage to mechanical injury.  
J Bone Joint Surg Am. 64(3):460-6. Review.
75. Maroudas AI (1976)  
Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and degenerate cartilage.  
Nature 260(5554):808-9.
76. Mauck RL, Yuan X, Tuan RS. (2006)  
Chondrogenic differentiation and functional maturation of bovine mesenchymal stem cells in long-term agarose culture.  
Osteoarthritis Cartilage. 14(2):179-89.
77. Mayne R, Vail MS, Mayne PM, Miller EJ. (1976)  
Changes in type of collagen synthesized as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity.  
Proc Natl Acad Sci USA 73(5):1674-8.
78. Mielke (1984)  
Degenerative rheumatische Erkrankungen.  
Rheumatologie
79. Miosge N, Hartmann M, Mielke C, Herken R. (2004)  
Expression of collagen type I and type II in consecutive stages of human osteoarthritis.  
Histochem Cell Biol. 122(3):229-36.

80. Mori K, Shioi A, Jono S, Nishizawa Y, Morii H (1999)  
Dexamethasone enhances In vitro vascular calcification by promoting osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol. (9):2112-8.
81. Morshead CM, Benveniste P, Iscove NN, van der Kooy D (2002)  
Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations.  
Nature Medicine (3):268-73
82. Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR. (1997)  
Mutations involving the transcription factor Cbfa1 cause Cleidocranial Dysplasia.  
Cell 89(5):773-9.
83. Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F. (2002)  
Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis.  
Arthritis Rheumatism 46(3):704-13.
84. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. (1996)  
AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver haematopoiesis,  
Cell 84(2):321-30.
85. Otte P. (2001)  
Der Arthrose-Prozess  
Teil 1: Osteochondrale Strukturen  
Novartis Pharma Verlag: 93-101



86. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. (1997)  
Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development.  
Cell 89(5):765-71.
87. Pacifici M, Golden EB, Adams SL, Shapiro IM. (1991)  
Cell hypertrophy and typeX collagen synthesis in cultured articular chondrocytes.  
Exp. Cell res. 192(1):266-70.
88. Paige KT, Cima LG, Yaremchuk MJ, Schloo BL, Vacanti JP, Vacanti CA. (1996)  
De novo cartilage generation using calcium alginate-chondrocyte constructs.  
Plast. Reconstr Surg 97(1):168-78;
89. Pei Y, Harvey A, Yu XP, Chandrasekhar S, Thirunavukkarasu K (2006)  
Differential regulation of cytokine-induced MMP-1 and MMP-13 expression by p38 kinase inhibitors in human chondrosarcoma cells: potential role of Runx2 in mediating p38 effects.  
Osteoarthritis Cartilage 14(8): 749-58
90. Pernas-Alonso R, Morelli F, di Porzio U., Perrone-Capano C. (1999)  
Multiplex semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction of low abundance neuronal mRNAs.  
Brain Reserch Protocols 4, 395-406
91. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A. (2000)  
Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee  
Clin Orthop. (374):212-34.

92. Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund EL, Lindahl A. (2002)  
Autologous chondrocyte transplantation : Biomechanics and long term durability.  
Am J. Sports Med. 30(1):2-12.
93. Prudden TM. (1881)  
Experimental studies on the Transplantation of cartilage.  
Am J Med Sci 164: 360-370
94. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moormann MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999)  
Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.  
Science 284(5411):143-7.
95. Rabie AB, Tang GH, Hagg U. (2004)  
Cbfa1 couples chondrocytes maturation and endochondral ossification in rat mandibular condylar cartilage.  
Arch Oral Biol. 49(2):109-18.
96. Radin EL, Swann DA, Paul IL, McGrath PJ (1982)  
Factors influencing articular cartilage wear in vitro  
Arthritis Rheum. 25:974-80
97. Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE, Sarkar G, Spelsberg TC, Riggs BL (1996)  
Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow.  
J Bone Miner Res 11 (3): 312-24, 1996.
98. Rinaldini LMJ. (1959)  
The isolation of living cells from animal tissues.  
Int Review Cytology 7: 587-647

99. Rizkalla G, Reiner A, Bogoch E, Poole AR. (1992)  
Studies of the articular cartilage proteoglycan aggrecan in health and osteoarthritis. Evidence for molecular heterogeneity and extensive molecular changes in disease.  
J. Clin. Invest. 90(6):2268-77
100. Robey PG, Termine JD. (1985)  
Human bone cells in vitro.  
Calcif. Tissue Int 37 (5): 453-60, 1985.
100. Roughley PJ, Lee ER. (1994)  
Cartilage proteoglycans: structure and potential functions.  
Microsc. Res. Technol. 1;28(5):385-97
101. Sasaki-Iwaoka H, Maruyama K, Endoh H, Komori T, Kato S, Kawashima H. (1999)  
A trans-acting enhancer modulates estrogen-mediated transcription of reporter genes in osteoblasts  
J Bone Miner Res. (2):248-55.
102. Schaefer DJ, Klemm C, Zhang XH, Stark GB. (2000)  
Tissue Engineering mit mesenchymalen Stammzellen zur Knorpel- und Knochenneubildung.  
Chirurg 2000 Sep;71(9):1001-8.
103. Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V, Schlegel J. (2002)  
Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture.  
Osteoarthritis Cartilage. Jan;10(1):62-70.

104. Schulz A, Battmann A, Heinrichs CM, Kern A, Tiedemann A, Bürger H, Fohr B, Hani N, Pietruck C, Busk H, Jundt G (1993)  
Properties and reactivity of a new human osteosarcoma cell line (HOS 58)  
Calcif Tissue int. 52 (Suppl.1): 30
105. Schulz A. (1995)  
„True bone“ in vitro? (editorial)  
Virchows Arch. 426: 103-5
106. Schulze-Tanzil G, de Souza P, Villegas Castrejon H, John T, Merker HJ, Scheid A, Shakibaei M. (2002)  
Redifferentiation of differentiated chondrocytes in high-density cultures.  
Cell Tissue Res. 308(3):371-9.
107. Sellner L.N., Turbett G.R. (1996)  
The Presence of Pseudogenes may affect the use of HPRT as an endogenous mRNA control in RT-PCR.  
Molecular and Cellular Probes 10, 481-483
108. Serra R, Johnson M, Filvaroff EH, LaBorde J, Sheehan DM, Derynck R, Moses HL. (1997)  
Expression of a truncated, kinase-defective TGF- $\beta$  type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis.  
J. Cell Biol. 139(2):541-52.
109. Siggelkow H, Niedhart C, Kurre W, Ihbe A, Schulz A, Atkinson MJ, Hübner M (1998)  
In vitro differentiation potential of a new human osteosarcoma cell line (HOS 58)  
Differentiation 63: 81-91

110. Siggelkow H, Schenck M, Rohde M, Viereck V, Tauber S, Atkinson MJ, Hüfner M. (2002)  
Prolonged culture of HOS 58 human osteosarcoma cells with 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>, TGF-beta, and dexamethasone reveals physiological regulation of alkaline phosphatase, dissociated osteocalcin gene expression, and protein synthesis and lack of mineralization.  
Journal of Cellular Biochemistry 85:2, 279
111. Sittinger M, Braunling J, Kastenbauer E, Hammer C, Burmester G, Bujia J. (1997)  
Proliferative potential of nasal septum chondrocytes for in vitro culture of cartilage transplants.  
Laryngorhinootologie 76(2):96-100.
112. Smith AU. (1965)  
Survival of frozen chondrocytes isolated from cartilage of adult mammals.  
Nature 205: 782-784
113. Statistisches Bundesamt (2002)  
Häufigste Diagnosen bei aus dem Krankenhaus entlassenen Patienten im Jahr 1999.
114. Stricker, S., Fundele, R., Vortkamp, A., und Mundlos, S. (2002)  
Role of Runx genes in chondrocyte differentiation.  
Dev. Biol. 245, 95-108.
115. Takeda S, Bonnamy JP, Owen MJ, Ducy P, Karsenty G. (2001)  
Continuous expression of Cbfa1 in non-hypertrophic Chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocytes differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice.  
Genes Dev. 15(4):467-81.

116. Tesche F, Miosge N. (2005)  
New aspects of the pathogenesis of osteoarthritis: the role of fibroblast-like chondrocytes in late stages of the disease.  
Histol Histopathol. 20(1):329-37.
117. Thonar EJ, Masuda K, Lenz ME, Hauselmann HJ, Kuettner KE, Manicourt DH. (1995)  
Serum markers of systemic disease processes in osteoarthritis,  
J. Rheumatology Suppl. 43:68-70.
118. Trippel SB (1995)  
Growth factor interactions on articular cartilage.  
J Rheumatology Suppl. 43:129-32.
119. Ueta C, Iwamoto M, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Enomoto-Iwamoto M, Ohmori T, Enomoto H, Nakata K, Takada K, Kurisu K, Komori T. (2001)  
Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes.  
J. Cell Biol. 153(1):87-100.
120. Van Kampen (1992)  
Two distinct metabolic pools of proteoglycans in articular cartilage.  
Articular cartilage and osteoarthritis
121. Van Lam S, Rabie AE (2005)  
Mechanical strain induces Cbfa1 and type X collagen expression in mandibular condyle.  
Front Biosci. 10:2966-71.
122. Von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Muller P. (1977)  
Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture.  
Nature 267(5611):531-2.

123. Von der Mark K. (1986)  
Differentiation, modulation and dedifferentiation of chondrocytes.  
Rheumatology 10:272-315.
124. Wagenhäuser (1984)  
Arthrose – Schicksal oder behandelbare Erkrankung?  
Aktuelle Rheumatologie
125. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM. (1994)  
Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage.  
J Bone Joint Surg Am 76(4):579-92.
126. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M. (2002)  
Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees.  
Osteoarthritis Cartilage 10(3):199-206.
127. Wang X, Manner PA, Horner A, Shum L, Tuan RS, Nuckolls GH (2004)  
Regulation of MMP-13 expression by RUNX2 and FGF2 in osteoarthritic cartilage.  
Osteoarthritis Cartilage. 12(12):963-73.
129. Yoshida CA, Yamamoto H, Fujita T, Furuichi T, Ito K, Inoue K, Yamana K, Zanma A, Takada K, Ito Y, und Komori T (2004)  
Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog.  
Genes Dev. 18, 952-963.

## 9. Anhang

### ERKLÄRUNG

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Giessen, den

Markus Schaller



**Wesentliche Teile waren Inhalt von folgenden Vorträgen, Posterpräsentationen und Buchbeiträgen:**

1. Battmann A, Nusselt T, Walz L, Schaller M, Hendrich C, Fink L, Haas H, Jürgensen I, Stahl U (2003)  
Chondrocytes  
in: C Hendrich, U Nöth, J. Eulert (Hrsg.) Cartilage Surgery and Future Perspectives. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 115-121
2. Stahl U, Lin X, Wenk J, Schaller M, Vassiliadou A, Schulz A, Battmann A (1999)  
The Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Antagonist Wortmannin Is a Potent Inhibitor of Proliferation in the Osteosarcoma Cell Line SAOS-2.  
J. Bone Min Res. 14, S 1: SA 175
3. Battmann A, Schaller M, Rose J, Bayer M, Kühling j, Stracke H, Bohle RM, Fink L, Schulz A, Stahl U (1999)  
Expression of Cbfa1 is dependent on the threedimensional Tissue Structure in Human Articular Chondrocytes in vitro.  
J Bone Min Res 15 (1999): 39.
4. Battmann A, Schaller M, Fink L, Rose J, Bohle RM, Schulz A, Stahl U (2000)  
Cbfa1 Expression is Upregulated in Human Articular Chondrocytes In Vitro: A Model for Regulation?  
J. Bone Min Res. 16, Suppl. 1: Mo52
5. Battmann A, Schaller M, Fink L, Rose J, Bohle RM, Schulz A, Stahl U (2001)  
Regulation of Cbfa1 Expression in human articular chondrocytes in vitro.  
Osteologie Verlag Hans Huber Bern Göttingen Seattle Toronto 10, Sup1, 146
6. Rose J, Schaller M, Bayer M, Kühling J, Bohle RM, Fink L, Stahl U, Schulz A, Battman A (2002)  
Cbfa 1 expression and its relationship to three dimensional tissue structure in human chondrocytes in vitro.  
Osteologie 11, Sup. 1, FV 7.4

7. Battmann A, Nusselt T, Walz L, Schaller M, Hendrich C, Fink L, Haas H, Jürgensen I, Stahl U. Chondrozyten. Osteoblast 2002, Würzburg 29-30 November 2002

## Liste der verwendeten Materialien

Agarose	(MBI Fermentas)
Alginat – Lösung	
Alginic Acid	(Sigma)
Ampli - Taq - Gold	(GeneAmp®Applied Biosystems)
Aqua ad injectabilia	(Braun)
Auflösepuffer	
CaCl <sub>2</sub> – Lösung	
CaCl <sub>2</sub> M 110, 99	(Merck)
Cellulose-Acetat Filter 0,2 µm	(Sartorius)
Collagenase Type XI	(Sigma)
Deoxyribonuclease	(Sigma)
DMEM/Ham's F-12 K	(Biochrom AG)
DMSO - Dimethylsulfoxid	(Merck)
Dnase I stock solution	(Qiagen)
DNTP	(Eurobio)
EDTA Ethylendinitrilotetraessigsäure M372,24	(entrpr. TRIPLEX®     Merck)
Ethanol 70%	(Riedel de Haën)
Ethanol 96%-100%	(Riedel de Haën)
Ethidiumbromid	
Fetal Bovine Serum	(Sigma)
Gelkammer	(Bächler Tech)
Glasfaser Vorfilter	(Sartorius)
Handschuhe	(Kimberly-Clark)
Hank's	(Biochrom AG)
Hinf I - Markers	(Promega)
Isotone Kochsalzlösung	(Baxter)
Kanülen Durchmesser: 20G*1½", 0,9*40	(Terumo)
Kanülen Durchmesser: 24G*1", 0,55*25	(Terumo)
Kühl-Tischzentrifuge 5417 R	(Eppendorf)
Kühlzentrifuge Rotanta/TRC	(Hettich)
Kulturflaschen	(BD Falcon)
Ladepuffer	

MgCl <sub>2</sub>	(Roche)
Minisart Sterilfilter 0,2 µm	(Sartorius)
Multipipette	(Eppendorf)
Multipipettenspitzen 12,5ml	(Brand)
Na-Citrat M 294,1	(Merck)
NaCl M 58,44	(Carl Roth GmbH+Co)
Natronlauge	(Merck)
PCR - Cyclor	(Tuchdown (ThermoHybaid))
Penicillin/Streptomycin	(Biochrom AG)
Petrischalen (Glas)- Durchmesser: 8,5cm	
Pinzetten steril	(Angiokard)
Pipet-Boy	(Integra Bioscience)
Pipette 1000µl	(Eppendorf)
Pipette 100µl	(Eppendorf)
Pipette 10µ	(Eppendorf)
Pipettenspitzen 1000µl	(Eppendorf)
Pipettenspitzen 100µl	(Eppendorf)
Pipettenspitzen 10µl	(Eppendorf)
Primer cbfa1 FW	(MWG Biotech AG)
Primer cbfa1 RV	(MWG Biotech AG)
Primer HPRT FP	(MWG Biotech AG)
Primer HPRT RP	(MWG Biotech AG)
Random Hexamers	(GeneAmp®Applied Biosystems)
RDD Buffer	(QiaqenRNeasy® Protect Mini Kit)
Reverse Transkriptase	(GeneAmp®Applied Biosystems)
RLT-Lysepuffer	(QiaqenRNeasy® Protect Mini Kit)
Rnase free water	(QiaqenRNeasy® Protect Mini Kit)
RNase Inhibitor	(GeneAmp®Applied Biosystems)
RNeasy Mini Column	(QiaqenRNeasy® Protect Mini Kit)
RPE Buffer	(QiaqenRNeasy® Protect Mini Kit)
RW1 - Buffer	(QiaqenRNeasy® Protect Mini Kit)
Skalpelle steril	(Feather)
Sterilfilter Porengröße: 0,20µm	(Sartorius)
TBS – Puffer	

Thermocycler	(TRIO-Thermoblock (Biometra))
Tischzentrifuge Biofuge A	(Heraeus)
Transforming Growth Factor beta 1	(Sigma)
Trypsin	(Gibco)
Vortexer: Minishaker MS 1	(Roth)
Wasserbad	(Mettler)

## Abkürzungsverzeichnis

1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub>
ACI	Autologe Chondrozyten-Implantation
ALP	Alkalische Phosphatase
BMP 2	bone morphogenetic protein 2
Cbfa1	Core-Binding-Factor 1
cAMP	zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fetales Kälberserum
HOS	humanes Osteosarkom
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
MMP 13	Matrix Metalloproteinase 13
MSC	Mesenchymale Stammzellen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PTHrP	parathyroid hormone-related peptide
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
VEGF	vascular endothelial growth factor

## **Danksagung**

Herrn Professor Dr. med. A. Schulz, dem Leiter des Institutes für Pathologie am Klinikum der Justus Liebig Universität Giessen möchte ich an dieser Stelle herzlich danken für die Überlassung des Themas sowie die Bereitstellung seiner Laboreinrichtungen.

Herrn Dr. med. A. Battmann gilt mein besonderer Dank für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten sowie für seine kritischen Anregungen und die ständige Diskussionsbereitschaft zu wissenschaftlichen Fragestellungen.

Desweiteren möchte ich mich ausdrücklich bei Herrn Dr. U. Stahl und Herrn Dr. L. Fink für die Einarbeitung in molekularbiologische Methodiken und die vielen Hilfestellungen bei der Etablierung derselben bedanken.

Frau M. Ross (Medizinisch-Technische Laborassistentin) möchte ich danken für die Einarbeitung und Beratung auf dem Gebiet der Zellkulturarbeiten

Den Mitarbeitern der Orthopädischen Universitätsklinik Giessen (Leiter: Prof. Dr. med. H. Stürz) gilt mein Dank für die Bereitstellung des Operationsmaterials.

Dank gilt auch Herrn J. Rose und Herrn J. Kühling für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Markus Schaller
Geburtsdatum/Geburtsort	20.11.1974 in Berlin

## Schulbildung

1981 – 1983	Grundschule Birkenhöhe, Wuppertal
1983 – 1985	Grundschule Uellendahl, Wuppertal
1985 – 1994	St. Anna-Gymnasium, Wuppertal
1994	Abitur

## Studium

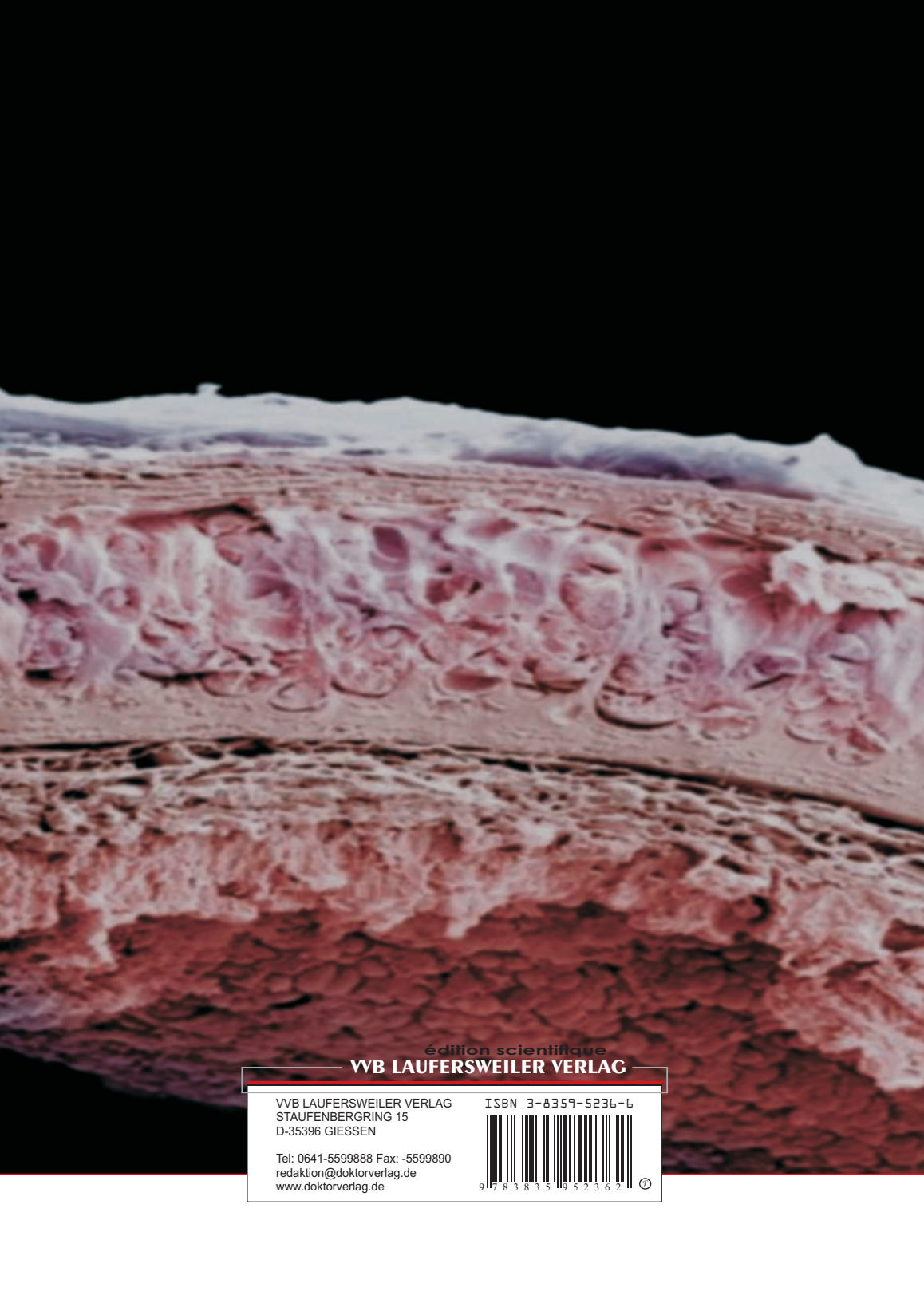
1995 – 2001	Justus-Liebig-Universität Giessen Studiengang: Humanmedizin
1997	Physikum
1998	1. Staatsexamen
2000	2. Staatsexamen
2001	3. Staatsexamen

## Beruflicher Werdegang

1.2.2002– 31.7.2003	Anstellung als „Arzt im Praktikum“ an der Medizinischen Klinik und Poliklinik III der Justus-Liebig-Universität Giessen,  Rodthohl 6 in 35385 Giessen, Leiter: Prof. Dr. med. R.G. Bretzel
Seit dem 01.08.2003	Erteilung der Vollapprobation und Anstellung als Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik und Poliklinik III des Universitätsklinikums Giessen und Marburg GmbH, Standort Giessen

Giessen, 2007





édition scientifique

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5236-6



Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

9 7 8 3 8 3 5 1 9 5 2 3 6 2 ①